



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LUIZA MARIA RAMOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE ADSORVENTE ALTERNATIVO NA EXTRAÇÃO
EM FASE SÓLIDA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
TECIDO MUSCULAR DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

**EVALUATION OF ALTERNATIVE ADSORBENT IN SOLID
PHASE EXTRACTION OF PESTICIDE RESIDUES IN MUSCULAR
TISSUE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LUIZA MARIA RAMOS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE ADSORVENTE ALTERNATIVO NA EXTRAÇÃO
EM FASE SÓLIDA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
TECIDO MUSCULAR DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

**EVALUATION OF ALTERNATIVE ADSORBENT IN SOLID
PHASE EXTRACTION OF PESTICIDE RESIDUES IN MUSCULAR
TISSUE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Master dissertation presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237s Santos, Luiza Maria Ramos dos
Avaliação de adsorvente alternativo na extração em fase sólida de resíduos de agrotóxicos em tecido muscular de tilápia (*Oreochromis niloticus*) = Evaluation of alternative adsorbent in solid phase extraction of pesticide residues in muscular tissue tilapia (*Oreochromis niloticus*) / Luiza Maria Ramos dos Santos ; orientador Sandro Navickiene. – São Cristóvão, 2017.
102 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Química. 2. Tilápia (Peixe). 3. Peixe – Criação. 4. Produtos químicos agrícolas. I. Navickiene, Sandro, orient. II. Título

CDU: 54:639.3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE

Programa de Pós-graduação em
Química - PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação
de Mestrado de Luiza Maria Ramos dos Santos
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Sergipe em
24/02/2017.

Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre
Departamento de Química – UFS

Prof.ª Dr.ª Débora Santos Silva Bezerra
Departamento de Química – UFS

RESUMO

O pescado representa a proteína animal mais consumida no mundo. O Brasil se destaca pela prática da piscicultura com notoriedade para a produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*). O cultivo de peixes está sujeito ao ataque de pragas e a aplicação de agrotóxicos tem sido usado como forma de controle. O presente trabalho objetiva o desenvolvimento de uma metodologia eficiente com base nas técnicas de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa/espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS) para determinação de resíduos dos agrotóxicos aldrin, ametrina, bromopropilato, bromuconazol, cipermetrina, clorpirifós, clorprofam, coumafós, esfenvalerato, etiona, permetrina, pirimicarbe, pirimifós metílico, procimidona e vinclozolina em tecido muscular de tilápia. Para tanto, a otimização das condições cromatográficas e a avaliação da melhor proposta de extração foram realizados. As condições de melhor resposta quantitativa foram obtidos com 0,25 g de amostra homogeneizada com 0,75 g de C₁₈, utilizando 0,5 g de alumina, eluído com 5 mL de acetonitrila. O biocarvão produzido a partir de rejeitos de coco foi também testado como adsorvente para a extração por DMFS e apresentou resultados satisfatórios de recuperação entre 70 ± 1,38% – 120 ± 5,55% para os níveis de concentração 0,02 a 0,1 µg g⁻¹. Os parâmetros avaliados para a validação do método foram: linearidade e sensibilidade, obtendo-se uma boa sensibilidade e resposta linear com coeficientes de 0,9999 no intervalo de 0,01 a 4 µg g⁻¹; seletividade, através de estudos de efeito matriz; exatidão e precisão com valores de recuperação entre 70 - 120% e coeficientes de variação na faixa de 0 a 16,69%, para os níveis de concentração 0,02 a 0,1 µg g⁻¹ (n=5) e limites de detecção e quantificação no intervalo de 0,0009 – 0,02 µg g⁻¹, respectivamente. O método desenvolvido se mostrou adequado para determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras de tilápia.

Palavras-chave: Tilápia; *Oreochromis niloticus*; agrotóxicos; DMFS; GC-MS/MS; Piscicultura.

ABSTRACT

*The fish products is the most commonly used animal protein in the world. Brazil stands out for pisciculture with emphasis on the production of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish farming is subject to attack by pests and pesticide application has been used as a form of control. This work aims at the development of an effective methodology based on the matrix solid phase dispersion (MSPD) and gas chromatography/spectrometry tandem mass (GC-MS/MS) techniques for determination of residues of aldrin, ametrina, bromopropylate, bromuconazole, cypermethrin, chlorpyrifos, chlorpropham, coumaphos, esfenvalerate, etion, permethrin, pirimicarb, pirimiphos methyl, procymidone, vinclozolin pesticides in muscle tissue of tilapia. Therefore, optimization of chromatographic and evaluation of best extraction conditions proposed were performed. The best quantitative response conditions were obtained with 0.25 g of sample homogenized with 0.75 g of adsorbent, using 0.5 g of auxiliary adsorbent, eluted with 5 mL of acetonitrile. The biochar produced from coconut wastes was tested as an adsorbent for DMFS extraction too and presented satisfactory recovery results between $70 \pm 1.38\%$ and $120 \pm 5.55\%$ at concentration levels 0.02 to $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$. The parameters evaluated for the validation of the method were: linearity and sensitivity, obtaining a good sensitivity and linear response with coefficients of 0.9999 in the range of 0.01 to $4 \mu\text{g g}^{-1}$; selectivity, through matrix effect studies; accuracy and precision with recovery values between $70 - 120\%$ and coefficients ranging from 0 to 16.69% for the concentration levels 0.02 to $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ ($n = 5$) and detection limits and quantification in the range of 0.01 to $0.0009 \mu\text{g g}^{-1}$ respectively. The method developed was adequate for the determination of residues of pesticides in samples of tilapia.*

Keywords: Tilapia; Oreochromis niloticus; pesticides; MSPD; GC-MS / MS; Pisciculture.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Tilápia.....	3
1.2 Agrotóxicos.....	4
1.3 Dispersão da Matriz em Fase Sólida.....	13
1.3.1 Adsorventes alternativos em DMFS.....	15
1.4 Cromatografia Gasosa.....	16
1.5 Validação de método analítico.....	17
1.6 Revisão de Literatura.....	18
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 Reagentes.....	24
3.2 Padrões certificados dos agrotóxicos.....	25
3.3 Equipamentos.....	25
3.4 Obtenção e preparo da amostra.....	25
3.5 Preparo das soluções padrão dos agrotóxicos.....	26
3.6 Condições cromatográficas de análise.....	26
3.7 Fortificação da amostra.....	26
3.8 Procedimento de extração por DMFS.....	27
3.9 Obtenção do biocarvão de coco.....	28
3.10 Limpeza de materiais.....	29
3.11 Descarte de resíduos.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Otimização das condições cromatográficas de análise.....	30
4.1.1 Criação do método MRM.....	32
4.1.2 Avaliação do método MRM.....	34
4.2 Otimização do método de extração.....	34
4.2.1 Escolha do solvente de eluição.....	35

4.2.2 Seleção do adsorvente dispersante e de limpeza.....	36
4.3 Validação do método analítico.....	53
4.3.1 Linearidade e sensibilidade.....	53
4.3.2 Seletividade.....	56
4.3.3 Exatidão e precisão.....	59
4.3.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	64
5. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	66
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7. REFERENCIAS.....	69

AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus, agradeço por manter-me firme e confiante e por ser um refúgio em tempos de aflição;

Ao Prof. Dr. Sandro Navickiene, pela orientação, paciência e dedicação;

À minha família, sempre apoiando e vibrando em cada decisão e conquista;

Ao meu esposo e melhor amigo Erinaldo;

As sinceras amizades construídas e a todos os colegas pelos momentos de descontração, companheirismo e ajuda;

Aos amigos Débora, Ewerton por toda ajuda prestada nas frequentes consultas;

Às amigas Kathamania, Jaqueline, Geise pelo companheirismo, coleguismo e consideração;

À Fabricio pelos ensinamentos iniciais;

À professora Dra Iramaia Correa pelo acompanhamento durante a coleta;

À Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Química e Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

À Universidade Federal do Paraná, ao LABPPAM – Laboratório de Processos e Projetos Ambientais (na pessoa do professor Antônio Mangrich e da Doutoranda Tassya Matos) pelo fornecimento do biocarvão utilizado no trabalho;

Aos professores do departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, Campus Itabaiana (DQCI) pelo apoio;

Aos colegas da AINTELAB;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço a todos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LMR	-	Limite Máximo de Resíduos
DMFS	-	Dispersão da Matriz em Fase Sólida
MSPD	-	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>
GC-MS	-	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>
DNA	-	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
HBL	-	<i>Hydrophilic-lipophilic balance material</i>
MIP	-	<i>Molecular Imprinted Polymers</i>
ATP	-	Trifosfato de Adenosina
CG	-	Cromatografia Gasosa
MS	-	<i>Mass Spectrometry</i>
EM	-	Espectrometria de Massas
C ₁₈	-	Octadecilsilano
MOF	-	<i>Metal-Organic Framework</i>
<i>m/z</i>	-	Relação massa carga
<i>r</i> ²	-	Coeficiente de determinação
SCAN	-	Modo de varredura linear
MRM	-	Monitoramento de Reações Múltiplas
K _{ow}	-	<i>Octanol/Water Partition Coefficient</i>
LC	-	<i>Liquid Chromatography</i>
UPLC	-	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
PDA	-	<i>Photodiode Array</i>

- SPE - *Solid Phase Extraction*
- ECD - *Electron Capture Detector*
- SPME - *Solid Phase Microextraction*
- PDMS-DVB - *Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene Fiber*
- ACN - Acetonitrila
- MeOH - Metanol
- AcEt - Acetato de Etila
- HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
- TQ - Triplo Quadrupolo
- PFTBA - Perfluorobutilamina
- TICC - *Total Ion Current Chromatogram*
- MWCNTs - *Multiwalled Carbon Nanotubes*
- IV - Espectroscopia na região do infravermelho
- MEV - Microscopia eletrônica de varredura

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem ilustrativa da Tilápia (<i>Oreochromus Niloticus</i>). Fonte: [22].....	3
Figura 2: Esquema de extração por DMFS. Fonte: Lanças, adaptado [56].....	14
Figura 3: Fluxograma do método desenvolvido.....	28
Figura 4: Cromatograma por monitoramento de reações múltiplas da solução padrão conjunta ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos agrotóxicos: (1) clorprofan; (2) pirimicarbe; (3) vinclozolina; (4) ametrina; (5) pirimifós metílico; (6) clorpirifós; (7) aldrin; (8) procimidona; (9) etiona; (10 e 12) bromuconazol; (11) bromopropilato; (13 e 15) permetrina; (14) coumafós; (16)cipermetrina e (17) esfenvalerato. Para condições cromatográficas de análise, ver Tópico 3.6.....	34
Figura 5: Cromatograma reconstituído a partir de todos os íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente Sílica (0,5 g) e coluna auxiliar C_{18} (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver tópico 3.6.....	37
Figura 6: Eficiência de extração dos agrotóxicos em tecido muscular de Tilápia (Proposta 1).....	38
Figura 7: Cromatograma reconstituído a partir de todos os íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente Florisil® (0,5 g) e coluna auxiliar C_{18} (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.....	39
Figura 8: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia (Proposta 2).....	39

- Figura 9:** Cromatograma reconstituído a partir de todos os íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente alumina neutra (0,5 g) e coluna auxiliar C₁₈ (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.....40
- Figura 10:** Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia (Proposta 3).....41
- Figura 11:** Cromatograma reconstituído a partir de todos os íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente C₁₈ (0,75 g) e coluna auxiliar alumina neutra (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.....43
- Figura 12:** Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia (Proposta 4).....43
- Figura 13:** Cromatograma reconstituído a partir de todos os íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente alumina neutra (0,5 g) e coluna auxiliar biocarvão de coco (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.....45
- Figura 14:** Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia (Proposta 5).....45
- Figura 15:** Aspecto da mistura peixe/biocarvão de coco após homogeneização.....46
- Figura 16:** Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente biocarvão de coco (0,25 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.....47
- Figura 17:** Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia (Proposta 6).....47

Figura 18: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente biocarvão de coco (0,25 g) e coluna auxiliar alumina neutra (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.....	48
Figura 19: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia (Proposta 7).....	49
Figura 20: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia – comparação entre as propostas 4 e 7.....	50
Figura 21: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia – comparação entre alumina ativada e sem tratamento, nas condições da Proposta 8.....	52
Figura 22: Imagens do local de coleta, em Itabaiana, Sergipe.....	66
Figura 23: Cromatograma por monitoramento de reações múltiplas da análise de tecido muscular de Tilápia coletada no centro de distribuição do município de Itabaiana-SE.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações gerais sobre os agrotóxicos em estudo. Fonte: [34 – 38].....	8
Tabela 2: Informações físico-químicas dos agrotóxicos em estudo. Fonte: [34 – 38].....	9
Tabela 3: Aplicação da dispersão da matriz em fase sólida para determinação de agrotóxicos e outras substâncias em pescado.....	23
Tabela 4: Tempos de retenção e fragmentos representativos dos agrotóxicos estudados.....	31
Tabela 5: Fragmentos e energias de colisão dos analitos no modo MRM.....	33
Tabela 6: Tamanho de partícula dos adsorventes usados no trabalho.....	42
Tabela 7: Equações da reta das curvas analíticas dos 15 agrotóxicos no solvente e no extrato da matriz e seus coeficientes de correlação (r).....	54
Tabela 8: Intervalos de concentrações, equações da reta, coeficientes de correlação e razão dos coeficientes angulares dos agrotóxicos.....	57
Tabela 9: Resultados de recuperação e coeficientes de variação para os quatro níveis de fortificação testados.....	60
Tabela 10: Resultados de coeficientes de variação (CV) para teste de precisão interdia.....	63
Tabela 11: Limite de detecção e quantificação dos agrotóxicos estudados.....	65

1. INTRODUÇÃO

O pescado é a proteína animal mais consumida no mundo. Em virtude disso, a piscicultura tem ganhado cada vez mais espaço no agronegócio brasileiro, sendo uma atividade altamente rentável, com considerável potencial de geração de empregos, relativo baixo custo de produção, sendo uma atividade economicamente competitiva, fornecendo produtos com alto valor nutricional, além de ser fonte de lazer e turismo [1].

O clima característico do Brasil aliado ao seu potencial hídrico tem proporcionado o crescimento da prática da aquicultura (produção de organismos que vivem em ambiente aquático) [3]. Isso tem gerado o aumento no número de pescadores (atualmente o Brasil conta com mais de 1 milhão) e investimentos por parte do governo, além de aumento em pesquisas e melhoramento genético das espécies [4]. O Brasil destaca-se como 12º país em produção aquícola, chegando a um rendimento de 166,8 milhões de toneladas de pescados de 2013-2015, com 486.642 toneladas de peixes produzidos, dos quais 260.985 toneladas de tilápia [54].

Para aumentar a produtividade na aquicultura e garantir a qualidade dos organismos cultivados, agrotóxicos têm sido utilizados visando regular o crescimento e controle de patologias e parasitas que podem comprometer a produção. Essa prática aumenta a produção, porém torna-se uma fonte de contaminação dos recursos hídricos e da biota, uma vez que esses produtos podem se espalhar pelo curso de água podendo causar contaminação nas espécies [2].

Além disso, o cultivo de organismos aquáticos próximos a locais de intensa atividade antropogênica, como práticas agrícolas, pode ocasionar o transporte de resíduos de agrotóxicos usados na agricultura, por escoamento superficial ou lixiviação, sendo esta outra fonte de contaminação para o meio aquático [6, 7].

Diante da problemática causada pelo uso de agrotóxicos, diferentes órgãos regulamentadores (como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, e o Conselho Nacional de Segurança Alimentar) têm voltado sua atenção para

o desenvolvimento de leis no intuito de garantir a segurança alimentar da população. Todavia, não existe legislação vigente no Brasil para o uso de agrotóxicos na aquicultura [8].

Apesar de não haver uma legislação específica, nem agrotóxicos com registro para o uso na prática da piscicultura/aquicultura [9], sabe-se que os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos para alimentos são da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, ou inferiores, ou seja, concentrações traços. Dessa forma, para um monitoramento efetivo dessas substâncias, é necessário uma metodologia sensível e eficiente.

A dispersão da matriz em fase sólida (DMFS, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion MSPD*) tem sido utilizada na extração de compostos orgânicos em amostras biológicas, alimentares e ambientais sólidas, de alta viscosidade ou semissólidas. Tendo como diferencial a versatilidade, simplicidade de execução e eficiência [10].

Dentre os adsorventes utilizados na DMFS, adsorventes alternativos como o biocarvão tem ganhado cada vez mais espaço pelas propriedades adsorptivas e facilidade de obtenção a partir de rejeitos de biomassa de agroindústrias [64].

Aliada à técnica DMFS, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) tem tornado possível a identificação e quantificação de dezenas de substâncias de uma amostra [11].

Diante deste contexto, o presente trabalho objetiva desenvolver uma metodologia simples e eficiente para determinação de resíduos dos agrotóxicos aldrin, ametrina, bromopropilato, bromuconazol, cipermetrina, clorpirifós, clorprofame, coumafós, esfenvalerato, etiona, permetrina, pirimicarbe, pirimifós metílico, procimidona e vinclozolina em tecido muscular de tilápia (*Oreochromis niloticus*) utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa com espectrômetro de massas sequencial (GC-MS/MS).

1.1 Tilápia

O Brasil apresenta abundante potencial para o desenvolvimento da aquicultura, contando com clima favorável para o desenvolvimento de organismos, mão-de-obra abundante, crescente mercado interno e disponibilidade de corpos d'água para construção de reservatórios de água doce. Dados do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura mostram que a produção brasileira de pescados em 2013 foi de 1.241.807 toneladas, sendo que 765.287 toneladas foram de origem da pesca (61,6%) e 476.512 toneladas de origem da aquicultura (38,4%) [5, 12].

Dentre as modalidades de aquicultura praticadas no Brasil, os tanques-rede apresentaram crescimento nos últimos anos, com destaque para a produção de tilápia (*Oreochromus niloticus*) (Figura 1), responsável por 87,3% das solicitações de cessão para uso de águas da União, cuja produção cresce cerca de 17% ao ano. Isso é explicado por diversos fatores: melhoramento genético da espécie, ração apropriada acessível, bom desenvolvimento em altas densidades, boa aceitação do mercado consumidor [4, 5].

A tilápia cultivada no Brasil possui duas origens, que são linhagens da tilápia nilótica: a tilápia tailandesa ou chitralada, originária da Tailândia e a tilápia de Bouaké, originária da Costa do Marfim. O cultivo inicial da espécie ocorreu na década de 70, começando pela tilápia de Bouaké e posteriormente, por volta da década de 90, ocorreu a introdução oficial da tilápia chitralada [13].

Figura 1: Imagem ilustrativa da Tilápia (*Oreochromus Niloticus*). **Fonte:** [22]



Além de potencial produtivo e comercial, a carne branca de textura firme, sabor delicado, fácil filetagem e ausência de odor forte e desagradável fazem da tilápia um peixe bastante consumido no Brasil e no mundo, com destaque

para a composição nutricional, conforme mostrada na Tabela A no Anexo, é uma boa fonte de proteínas, minerais e outros nutrientes importantes para uma alimentação saudável e equilibrada [13].

A prática da aquicultura com confinamento de alta densidade populacional e a falta de cuidados sanitários indispensáveis favorecem o desenvolvimento de doenças e parasitas. Visando minimizar esse efeito, melhorar a produção e garantir a qualidade do produto final, drogas veterinárias, algicidas, larvicidas, herbicidas, fungicidas, moluscicidas têm sido amplamente usados na aquicultura. O uso intensivo dessas substâncias, com potencial biomagnificação e bioacumulação, tem sido um risco ao ecossistema aquático e à saúde do consumidor desses produtos [2, 9].

1.2 Agrotóxicos

A legislação vigente mais expressiva no Brasil para uso de agrotóxicos é a Lei nº 7802/89, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02 [15], que define agrotóxico como *“produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Também são considerados agrotóxicos as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento.”* Podendo ser classificados como agrícolas e não-agrícolas.

Conforme mencionado anteriormente, uma das técnicas mais utilizadas no controle de pragas em diferentes cultivos é o uso de agrotóxicos. Porém a resistência crescente das diferentes espécies de insetos e pragas, têm sido um desafio para a continuação dessa prática, e tem dado espaço para desenvolvimento de novas técnicas e produtos de controle de ação mais seletivo e eficiente [16].

O uso intensivo, ao longo de décadas, de agrotóxicos sem considerações ambientais e de saúde pública tem originado efeitos nocivos à saúde humana, sendo os efeitos de maior preocupação os mutagênicos (que causam

alterações no DNA), carcinogênicos (causam câncer) e teratogênicos (causam defeitos em fetos) [8].

Várias classificações podem ser atribuídas aos agrotóxicos: quanto ao modo de ação, grupo químico, toxicidade, quanto à origem e ainda características físico-químicas [17].

Quanto ao modo de ação, os agrotóxicos caracterizam-se pelo organismo alvo no qual agem, podendo ser acaricidas, larvicidas, moluscicidas, bactericidas, herbicidas, fungicidas, inseticidas, algicidas, avicidas, dentre outros [8].

Quanto à toxicidade, de acordo com a Portaria nº 3, do Ministério da Saúde, de 16 de janeiro de 1992, os agrotóxicos são divididos em classes, que variam de I a IV correspondendo a extremamente, altamente, moderadamente ou pouco tóxicos, respectivamente [18].

No que diz respeito à classe química, os agrotóxicos selecionados nesse trabalho, são:

Organoclorados: compostos orgânicos que apresentam cloro em sua formulação, tendo várias propriedades notáveis como estabilidade frente à decomposição, baixa solubilidade em água, toxicidade alta para insetos e relativamente baixa para mamíferos [8, 16].

Triazinas: possuem relativa simetria em sua estrutura aromática, e constituem uma classe de herbicidas normalmente aplicados no solo, principalmente em culturas de milho e soja. Agem impedindo a fotossíntese das ervas daninhas. A alta concentração dessa classe de agrotóxicos por vezes é relacionada ao câncer e aos defeitos de nascença [8, 16].

Benzilatos: inibidores de transporte celular, existem poucos estudos sobre essa classe [19].

Piretróides: na busca por um composto menos agressivo e mais natural, surgiram os piretróides, substâncias semissintéticas obtidas da piretrina encontrada em uma flor, a *piretrum*. Essa classe é amplamente utilizada no controle de pragas domésticas como mosquitos e piolhos [8, 16].

Organofosforados: derivados do ácido fosfórico, trata-se de uma classe de agrotóxicos que não são persistentes, pois se degradam em moléculas simples, solúveis em água. Embora não sejam persistentes por um lado, são altamente potentes por outro. Os organofosforados atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase, uma enzima do sistema nervoso dos insetos, responsável pela ação dos neurotransmissores [8, 16].

Carbamatos: agem semelhante aos organofosforados, diferenciando-se apenas pelo fato de que é um átomo de carbono que inibe a atividade enzimática, e não um átomo de fósforo. São derivados do ácido carbâmico [8, 16].

Dicarboximidas: apresentam atividade preventiva e curativa e agem impedindo a divisão celular [20].

Semelhante à agricultura, na aquicultura também são usadas formulações e produtos visando aumentar a produtividade e qualidade dos alimentos produzidos. Dentre os agrotóxicos usados na aquicultura, os inseticidas são os mais usados, sendo aplicados de maneira intensiva [2].

No Brasil, não existe nenhum produto registrado para uso na aquicultura, uma vez que não existe ainda legislação específica para esse uso e os estudos sobre os efeitos da utilização de agrotóxicos na aquicultura ainda são insuficientes. Por isso, é possível encontrar formulações de uso veterinário ou agrícola sendo usadas no controle de parasitas dessa cultura [21].

A falta de legislação e produtos regulamentados aumenta o abuso e uso incorreto de formulações, acarretando grande risco para os corpos d'água que servem como ambiente de cultivo, através da contaminação da biota presente, e provável biomagnificação dos agrotóxicos. Esses agravantes constituem um problema ambiental e de saúde pública [2, 21].

Os agrotóxicos selecionados para esse estudo foram escolhidos com base no amplo uso desses em diferentes culturas, bem como da persistência dos mesmos no ambiente, como no caso dos organoclorados, por exemplo.

Vale salientar que embora alguns desses agrotóxicos não sejam diretamente usados na piscicultura, estes podem ser lixiviados ou escoados

para corpos d'água, quando culturas agrícolas são realizadas próximos a locais de práticas da piscicultura [6]. As Tabelas 1 e 2 mostram as informações gerais, fórmulas estruturais e propriedades físico-químicas dos agrotóxicos em estudo.

Tabela 1: Informações gerais sobre os agrotóxicos em estudo. **Fonte:** [34 – 38].

Agrotóxico	Fórmula Molecular	Classe Química	Modo de Ação	Classe Toxicológica	Limite Máximo de Resíduos
Aldrin	$C_{12}H_8Cl_6$	Organoclorado	Inseticida	I	15 mg Kg ^{-1*}
Ametrina	$C_9H_{17}N_5S$	Triazol	Herbicida	III	3,2 mg L ^{-1**}
Bromopropilato	$C_{17}H_{16}Br_2O_3$	Benzilato	Acaricida	III	-
Bromuconazol	$C_{13}H_{12}BrCl_2N_3O$	Triazol	Fungicida	III	-
Cipermetrina	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	Piretróide	Inseticida/ Formicida	II	-
Clorpirifós	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	Organofosforado	Inseticida/ Formicida/ Acaricida	II	-
Clorprofam	$C_{10}H_{12}ClNO_2$	Carbamato	Herbicida	-	-
Coumafós	$C_{14}H_{16}ClO_5PS$	Organofosforado	Inseticida	-	-
Esfenvalerato	$C_{25}H_{22}ClNO_3$	Piretróide	Inseticida	II	0,00069 mg L ^{-1**}
Etiona	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$	Organofosforado	Inseticida/Acaricida	II	-
Permetrina	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	Piretróide	Inseticida/ Formicida	III	0,0041 mg L ^{-1**}
Pirimicarbe	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	Carbamato	Inseticida	II	-
Pirimifós Metílico	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	Organofosforado	Inseticida/ Acaricida	III	-
Procimidona	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	Dicarboximida	Fungicida	IV	-
Vinclozolina	$C_{12}H_9Cl_2NO_3$	Dicarboximida	Fungicida	IV	-

*peixe de cultivo; **parâmetro de toxicidade para organismos aquáticos [55].

Tabela 2: Informações físico-químicas dos agrotóxicos em estudo. **Fonte:** [34 – 38].

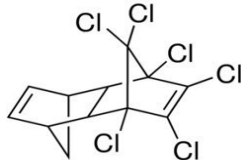
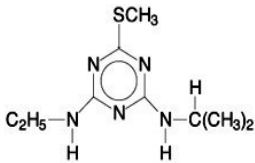
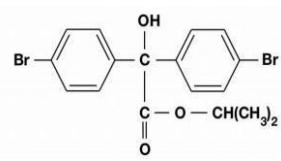
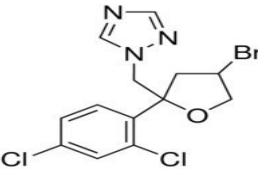
Agrotóxico	Fórmula estrutural	MM (g mol ⁻¹)	Ponto de Ebulição (°C)	Log Kow	pKa	Pressão de vapor (mmHg) a 25°C	Solubilidade (g L ⁻¹)
Aldrin		364,91	145,0	6,50	-	8 x 10 ⁻⁵	>600 em acetona, benzeno, xileno. Solúvel em solventes aromáticos, ésteres, parafinas e halogenados Água 0,027 mg L ⁻¹
Ametrina		227,33	337,0	2,98	4,10	2,74 x 10 ⁻⁶	Acetona 620 Metanol 510 Tolueno 470 n-octanol 220 hexano 12 água 0,21
Bromopropilato		428,11	504,5	5,40	-	5,35 x 10 ⁻¹¹	Acetona 850 Diclorometano 970 Benzeno 750 Metanol 280 Isopropanol 90 Água 1 mg L ⁻¹
Bromuconazol		377,06	504,3	3,24	2,75	3 x 10 ⁻⁸	Acetona 320 Diclorometano 500 Acetato de etila 230 n-hexano 20 Metanol 300 n-octanol 60 Água 610

Tabela 2: continuação

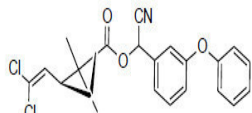
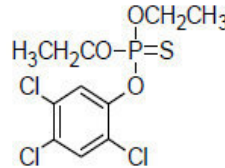
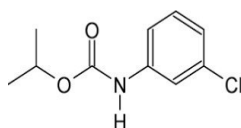
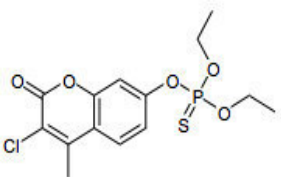
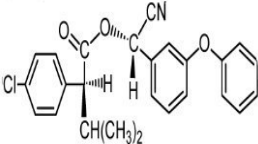
Cipermetrina		416,3	220,0	6,60	-	$1,7 \times 10^{-9}$ (20° C)	>450 em acetona, clorofórmio, etanol, hexano, xileno Água 4×10^{-3} mg L ⁻¹
Clorpirifós		350,59	160,0	4,96	4,55	$1,87 \times 10^{-5}$	Acetona 650 Benzeno 790 Clorofórmio 630 Etanol 63 Acetato de etila > 200 Metanol 450 Água 1,4 mg L ⁻¹
Clorprofame		213,66	247,0	3,51	-	$7,5 \times 10^{-6}$	Miscível em acetona, solventes aromáticos, etanol, isopropanol, cetonas. Água 89 mg L ⁻¹
Coumafós		362,76	449,9	4,13	-7,30	$9,7 \times 10^{-8}$ (20° C)	Acetona 238 Xileno 0,9 n-octanol 1,3 Hexano 0,7 Água 1,5 mg L ⁻¹
Esfenvalerato		419,90	151 – 167	6,22	-	$0 \pm 1,4$	>600 em xileno, acetona, clorofórmio, acetato de etila. Hexano 10-50 Metanol 70-100 Água 2×10^{-3} mg L ⁻¹

Tabela 2: continuação

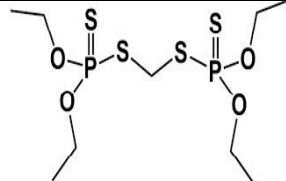
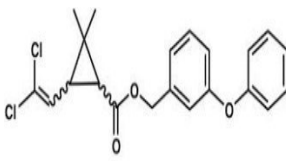
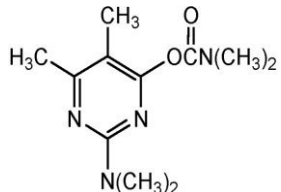
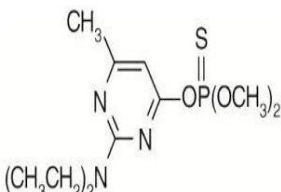
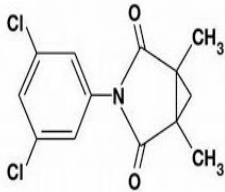
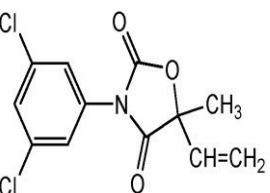
Etiona		384,48	150,0	5,07	-	$1,5 \times 10^{-6}$	Solúvel em metanol, etanol, xileno, clorofórmio, acetona. Água 2 mg L^{-1}
Permetrina		391,29	200,0	6,50	-7,10	$5,18 \times 10^{-8}$	Xileno e hexano >1000 Metanol 258 Solúvel em acetona, etanol, éter e xileno Água $6 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$
Pirimicarbe		238,29	373,4	1,70	4,53	$7,28 \times 10^{-6}$	Acetona 4 Etanol 2,5 Xileno 2,9 Clorofórmio 3,3 Água $2,7 \text{ mg L}^{-1}$
Pirimifós Metílico		305,33	Decomposto na destilação	4,12	4,30	$1,5 \times 10^{-5} (20^\circ \text{ C})$	Amplamente miscível em solventes orgânicos Água 10 mg L^{-1}

Tabela 2: continuação

Procimidona		284,14	477,9	3,14	-	$1,32 \times 10^{-4}$	Acetona 180 Acetonitrila 101 Acetato de etila 115 Metanol 16 Xileno 43 Água 4,5 mg L ⁻¹
Vinclozolina		286,11	369,0	3,10	-5,30	$1,2 \times 10^{-7}$ (20° C)	Metanol 15,4 Acetona 334 Acetato de etila 233 Tolueno 109 Diclorometano 475 Água 2,6 mg L ⁻¹

1.3 Dispersão da Matriz em Fase Sólida

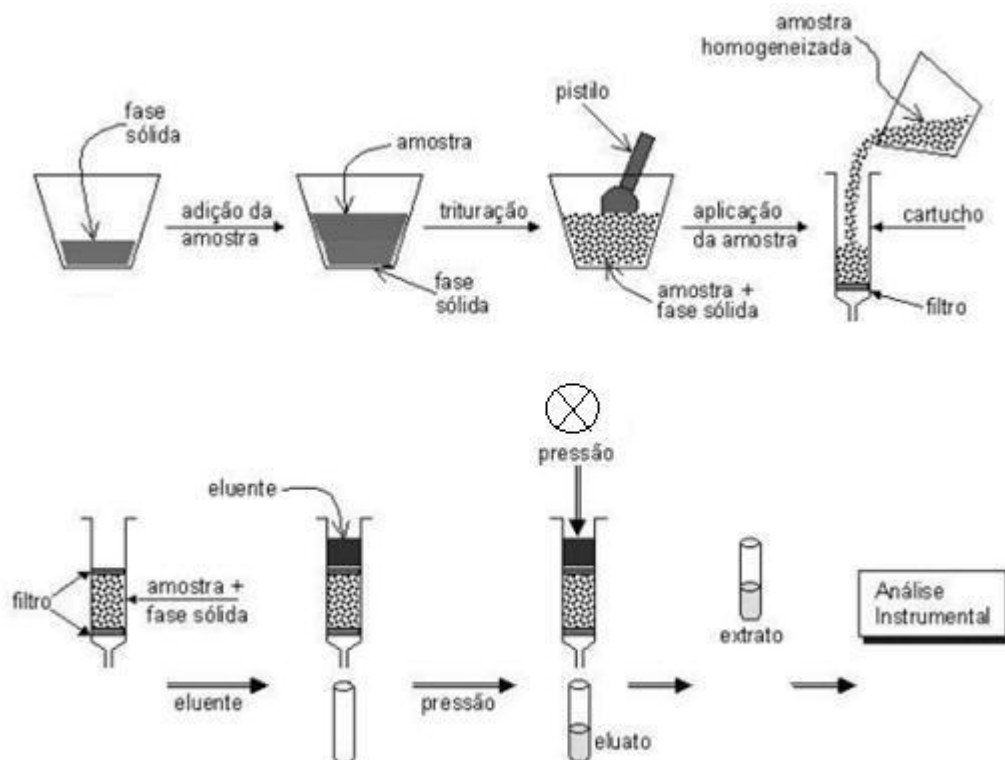
A preparação da amostra é uma etapa importante em um procedimento de análise química, visto que afeta significativamente o tempo total, a qualidade e o custo das análises. Um bom método de preparação deve ser capaz de concentrar os analitos de interesse, remover interferentes, evitar a degradação dos analitos e a formação de subprodutos do processo e ainda minimizar o efeito matriz [23].

A demanda por um preparo de amostra eficiente, rápido, robusto e sustentável na análise de compostos orgânicos em diferentes matrizes sólidas deu origem em 1989 a uma técnica de extração conhecida como dispersão da matriz em fase sólida (DMFS, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion* MSPD), criada por Steven Barker e colaboradores [10].

Em um trabalho inicial, Steven Barker e colaboradores descreveram a extração de fármacos em carne bovina, tomando como referência o princípio da extração em fase sólida [10, 24].

A DMFS é uma técnica relativamente simples, consistindo na mistura mecânica de uma amostra sólida, semissólida ou altamente viscosa a um suporte adsorvente até a distribuição uniforme e interação entre a matriz e o suporte, até formarem um único sólido de aspecto pulverulento. Essa mistura é então transferida para uma coluna, a fim de ser eluída com solvente apropriado [10, 25]. A Figura 2 mostra um esquema da técnica.

Figura 2: Esquema de extração por DMFS. **Fonte:** Lanças, adaptado [56].



A interação entre o analito e o suporte dá-se por meio de mecanismos de sorção como interações dipolo-dipolo e forças intermoleculares fracas do tipo van de Waals. O suporte, agindo como material abrasivo e dispersante, proporciona a distribuição da matriz e dos analitos em sua superfície [10].

São inúmeras as vantagens do uso da DMFS como técnica de preparo da amostra: seletividade, flexibilidade, podendo ser aplicada à uma ampla variedade de matrizes para uma ampla classe de analitos, possibilidade de extração e limpeza (*clean-up*) em um único passo resultando em tratamento rápido da amostra e baixo consumo de solvente se comparado com outras técnicas de extração/preparo [26].

A técnica DMFS apresenta algumas limitações quanto à reprodutibilidade da técnica: a pressão aplicada na homogeneização da amostra, o tempo de homogeneização fazem a DMFS ter baixa reprodutibilidade quando usada em controle interlaboratorial. Outra limitação da técnica é com relação à automação, a etapa de homogeneização deve ser realizada por um operador [10].

Alguns parâmetros importantes devem ser observados na execução da DMFS para se obter melhor eficiência no processo, dentre eles pode-se citar: o suporte adsorvente e quantidade do suporte que dependerá do tipo de amostra e das características físico-químicas do material; homogeneização, em que o tempo gasto e a força aplicada devem ser controlados e suficientes; uso de adsorvente auxiliar e quantidade de adsorvente auxiliar, atuando na limpeza do extrato para redução de interferentes; solvente de eluição e volume de eluição necessário para recuperação efetiva dos analitos [10, 23].

1.3.1 Adsorventes alternativos em DMFS

Nos últimos anos, as técnicas de preparação de amostra têm ganhado cada vez mais atenção em função da crescente demanda de métodos de preparação robustos, seletivos, rápidos. Nas técnicas de preparação de amostra que utilizam o princípio da adsorção, uma das principais mudanças e inovações diz respeito à novos materiais usados como adsorventes [23].

O custo dos adsorventes comerciais normalmente utilizados na determinação de contaminantes tem contribuído para a avaliação de adsorventes alternativos. Adsorventes não convencionais como polímeros de coordenação, nanotubos de carbono e bioadsorventes vem sendo utilizados para remoção de contaminantes em diferentes matrizes [60, 61]. Dentre os adsorventes testados, o biocarvão originário de diferentes biomassas têm sido aplicado na adsorção de contaminantes orgânicos [61, 62].

Mandal et al., 2017 definem biocarvão como substância altamente aromática derivada da biomassa produzida através da pirólise e carbonização de biomassa sob exclusão total ou parcial de oxigênio. Esse material pode ser produzido a partir de diferentes biomassas precursoras: resíduos de vegetais, lama de esgotos urbanos, resíduos industriais de biomassa. Além disso, anualmente, resíduos vegetais na ordem de megatoneladas tem sido gerados e queimados ocasionando uma carga ambiental muito densa sob a forma de poluição atmosférica e geração de resíduo sólido sem valor agregado [64, 65].

A produção de biocarvão através da pirólise é também fonte de óleos e gases de síntese que podem ser usados como fontes de energia, tornando o

processo de produção ambiental e economicamente amigável e contribuindo para atenuar mudanças climáticas uma vez que diminui a emissão de CO₂ quando comparado com o processo de queima tradicional [64-66].

O biocarvão apresenta características que favorecem seu uso como adsorvente, a saber: vasta área superficial, rico em matéria orgânica e superfície porosa. Atualmente a literatura relata vários usos para esse material como remediação do solo, atuando na mobilidade de contaminantes e nutrientes, e adsorção de contaminantes (incluindo agrotóxicos) em algumas matrizes, por exemplo [50, 63-66].

Mandal et al., 2017, acima citado, desenvolveram um trabalho onde foram testados e caracterizados biocarvões produzidos a partir de 5 diferentes resíduos agrícolas (lascas de bambu, espiga de milho, casca de eucalipto, casca de arroz e palha de arroz), para remover 2 agrotóxicos – imidacloprido e atrazina – em água. Os valores mais altos de adsorção foram obtidos pelo biocarvão feito da palha de arroz (39,9 – 77,8% para imidacloprido e 37,5 – 70,7% para atrazina) atestando a capacidade de adsorção desse material [64].

As diferentes biomassas e condições usadas como precursoras na síntese do biocarvão originam materiais com diferentes perfis e características físico-químicas próprias, que influenciam diretamente nas propriedades do biocarvão produzido, sendo portanto necessário caracterizar esse material de forma a conhecer suas propriedades antes de usá-lo [64,65].

1.4 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa (CG, ou GC, do inglês *Gas Chromatography*) é uma técnica de separação amplamente utilizada na análise de gases e substâncias volatilizáveis, termicamente estáveis. A separação ocorre pela difusão dos analitos entre uma fase móvel (gasosa) e uma fase estacionária (líquida ou sólida) [11].

Dentre os sistemas de detecção mais utilizados na hifenização da cromatografia gasosa, está o espectrômetro de massas (EM, ou MS, do inglês *Mass Spectrometry*). O sistema CG/EM apresenta alta sensibilidade, boa

resolução e origina um espectro de massas que fornece informações estruturais do analito em questão [29].

Este trabalho utilizou a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial como técnica de separação e análise dos agrotóxicos aldrin, ametrina, bromopropilato, bromuconazol, cipermetrina, clorpirifós, clorprofame, coumafós, esfenvalerato, etiona, permetrina, pirimicarbe, pirimifós metílico, procimidona e vinclozolina, uma vez que os analitos estudados são volatilizáveis (ver Tabela 2, pressão de vapor) e capazes de gerar íons para quantificação no sistema GC/MS-MS.

1.5 Validação de método analítico

A fim de garantir a eficácia e qualidade de um método analítico é necessário uma avaliação de diferentes parâmetros de qualidade de modo a assegurar que tal método, quando corretamente executado, produzirá resultados confiáveis com precisão adequada. Essa avaliação chama-se validação e permite explorar o método em questão expondo variáveis críticas, potenciais fontes de erro e adequação ao uso [69, 70].

No Brasil as agências governamentais responsáveis pelo controle de qualidade em laboratórios de ensaios são: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) que listam alguns parâmetros a serem avaliados no processo de validação de um método: exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade, robustez, entre outros. Neste trabalho os parâmetros contemplados foram: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. [36, 68]

Entende-se por linearidade a resposta proporcional obtida em resultado da concentração do analito em uma faixa de concentração apropriada. Para validação, é recomendado análise de no mínimo cinco concentrações diferentes [36, 49, 67]. Na prática, pode-se determinar a linearidade através de gráficos de calibração em que um gráfico é construído relacionando a resposta do equipamento às diferentes concentrações. Através desse gráfico, um

modelo matemático de regressão linear pode ser usado para a obtenção dos coeficientes de regressão x e y da curva e do coeficiente de correlação r , este último usado para uma estimativa da qualidade da curva. A ANVISA prevê um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99, e para o INMETRO 0,90 é um valor aceitável [36, 68].

A sensibilidade está associada a capacidade do método distinguir concentrações próximas com fidelidade. Esse parâmetro pode ser definido pela inclinação da reta (coeficiente angular) obtida no gráfico de calibração, onde quanto mais inclinada a reta, maior a sensibilidade do método [57, 67].

A seletividade de um método analítico faz referência a integridade dos picos cromatográficos, ou seja, a identificação inequívoca do analito frente aos interferentes presentes numa matriz complexa, permitindo a quantificação real do analito no método proposto [49, 67].

A concordância entre os valores obtidos pela análise em sequência sob condições analíticas muito próximas representa a precisão do método. Já a exatidão é medida em termos dos desvios entre os valores obtidos e os valores adotados como verdadeiros [57, 67, 68].

Toda técnica instrumental analítica apresenta um sinal para uma quantidade mínima do analito exposto [67]. A quantidade mínima de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada com exatidão, ou seja que pode ser distinguida do “ruído” do equipamento, é o limite de detecção (LD). Já o limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a menor concentração da substância em estudo que pode ser quantificada pelo método proposto com exatidão e precisão controladas [49, 57].

1.6 Revisão de Literatura

Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos de determinação de agrotóxicos em peixe utilizando a técnica dispersão da matriz em fase sólida (DMFS). No entanto, nenhum trabalho aborda a determinação de agrotóxicos em tecido muscular de tilápia (*Oreochromis niloticus*) utilizando a DMFS com sorventes alternativos e a cromatografia gasosa com espectrometria de massas sequencial.

Dessa forma, a Tabela 3 descreve alguns trabalhos que utilizaram a DMFS para determinação de resíduos de agrotóxicos e outras substâncias em peixe.

Shen *et al.*, 2016 [40], desenvolveram um método rápido (13 min) de extração de antibióticos sulfonamidas em tecido de peixe (*Collichthys niveatus*) utilizando a DMFS em microescala, HBL (do inglês, *hydrophilic–lipophilic balance material*) como adsorvente e uma ponta de pipeta como cartucho. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida/espectrometria de massas sequencial, LC-MS/MS. O procedimento consistiu na mistura de 10 mg de amostra liofilizada com 20 mg de HBL. A mistura foi transferida para uma ponteira que foi tampada para evitar perda. Em seguida, a ponteira foi conectada a uma micropipeta e 200 µL de uma mistura (metanol/água/amônia, 50:49:1, v/v/v) foi aspirada/dispensada pela micropipeta pelo menos 25 vezes. Quatorze sulfonamidas foram eluídas e os valores de recuperação foram de 70,6 a 95,5%.

Pan *et al.*, 2015 [41], determinaram os antibióticos cloranfenicol, tianfenicol e florfenicol em músculo de peixe corvina amarela (*Pseudosciaena crocea*), usando a DMFS e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas sequencial –UPLC-MS/MS. No método proposto, 2 g de amostra foram homogeneizadas com 3 g de C₁₈. A mistura foi transferida para uma coluna de vidro e em seguida lavada com 8 mL de n-hexano. Os analitos foram eluídos com 10 mL de acetonitrila/água (50:50, v/v). Ao eluato, foi acrescentado 6 mL de acetato de etila e agitado em vórtex por 1 min. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado. A dissolução em acetato de etila foi repetida duas vezes. O sobrenadante coletado foi seco em suave corrente de N₂ e o resíduo foi redissolvido em 1 mL de metanol/água (10:90, v/v). O método obteve recuperações na faixa de 84,2 – 99,8%.

Cela-Pérez *et al.*, 2015 [42], desenvolveram um método usando um polímero molecular (MIP) como adsorvente para determinação de três derivados de trifosfato de adenosina (ATP) - já que subprodutos da degradação de ATP são usados para avaliação de frescor do peixe - utilizando a dispersão da matriz em fase sólida combinada com cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos (MSPD-UPLC-PDA). No método

foi usado 0,2 g de amostra homogeneizada com 0,4 g de MIP. A mistura foi transferida para um cartucho de 6 mL de SPE pré-empacotado com 0,05 g de MIP. A eluição foi feita com 2 mL de n-hexano, com auxílio de um sistema à vácuo. O eluato foi evaporado até a secar sob temperatura ambiente, e o resíduo foi redissolvido em 2 mL de água ultrapura para posterior análise UPLC-PDA. Em seguida, o cartucho foi eluído com 4 mL de solução de hidróxido de amônio (pH 9) e analisado em UPLC-PDA para determinação de um dos produtos de degradação da ATP. A recuperação, considerando os três analitos analisados, foi de 103,1 a 113,4% e o método desenvolvido mostrou-se eficiente.

Chen *et al.*, 2014 [43], desenvolveram um método para determinação de quatro retardantes de chama clorados em tecido de peixe por DMFS e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-ECNICI-MS). As espécies estudadas foram: robalo riscado (*Morone saxatilis*), tilápia (*Oreochromis mossambicus*), salmão (*Salmo salar*) e bacalhau (*Gadus morhua*). A melhor condição foi obtida pelo uso de 1 g de amostra liofilizada dispersa em 2 g de sílica gel, que foi transferida para um cartucho de SPE contendo 1 g de Florisil® (adsorvente de limpeza), eluído com 20 mL de n-hexano. O eluato foi seco em evaporador rotatório seguido de corrente branda de N₂. O resíduo foi redissolvido em 20 µL de solução de acetona contendo padrão interno e analisado por GC-ECNICI-MS. O método mostrou-se eficiente com recuperações na faixa de 88 a 96%.

Tao *et al.*, 2014 [44], utilizaram a DMFS e a cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial LC-MS/MS para determinar antibióticos em peixe e camarão. Para o peixe, foi utilizado o músculo e a pele homogeneizados. O procedimento foi desenvolvido com 1 g de amostra dispersa em 2 g de C₁₈ colocada em uma coluna de vidro, eluído com acetato de etila/acetonitrila/hidróxido de amônio a 25% (10:88:2, v/v/v). O eluato foi recolhido sob gravidade em um tubo de vidro, seco sob uma corrente branda de N₂ e, o resíduo foi redissolvido em 1,0 mL de solução de acetato de amônio com 5% de metanol e 0,1% de ácido fórmico 5 mmol L⁻¹ e levado para análise no LC-MS/MS. As recuperações do método foram de 83,8 a 98,8%.

Caldas *et al.*, 2013 [33], desenvolveram um método baseado na dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) assistida por vórtex e cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS) para determinar os agrotóxicos dimetoato, atrazina, clomazona, fenitrotiona, malationa, fipronil e tebuconazol em fígado de peixe e hepatopâncreas de caranguejo. O peixe utilizado foi a corvina (*Micropogonias furnieri*) e o caranguejo foi o siri-azul (*Callinectes sapidus*) coletados em região de estuário, na Lagoa dos Patos (sul do Brasil), região onde a atividade agrícola é intensa. A melhor condição foi estabelecida pelo uso de 1,0 g de C₁₈, 0,2 g para o fígado ou 0,5 g para o hepatopâncreas, 5 mL de acetonitrila como solvente de eluição seguido por agitação em vórtex por 1 minuto, apresentando recuperações que variaram entre 57 e 107% para o fígado de peixe e entre 56 e 122% para o hepatopâncreas de caranguejo. Este trabalho apresenta o diferencial de ter utilizado C₁₈ extraído de cartucho de SPE já utilizado para pré-concentrar agrotóxicos em água potável. O procedimento utilizado para garantir a ausência de contaminação no C₁₈ foi descrito por Rodrigues *et al.*, 2010 [39].

Rezaei *et al.*, 2011 [32], desenvolveram um método baseado em extração por ultrassom assistida por DMFS miniaturizada, combinada com extração homogênea líquido-líquido para determinação de agrotóxicos organoclorados (heptaclor, aldrin, DDE, DDD, lindano e endrin) em tecido do peixe truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), analisado por cromatografia gasosa com detecção de captura de elétrons (GC-ECD). O procedimento DMFS utilizou 0,1 g de amostra, 0,4 g de C₁₈ como dispersante, 0,1 g de Florisil® como adsorvente de limpeza (cocoluna), colocados em uma seringa de capacidade de 5 mL e 1,5 mL de acetonitrila como solvente extrator. Após a adição do solvente extrator, o cartucho foi fechado e transferido para um banho ultrassom (37 kHz, 40°C/10 min). Feita a sonicação, as tampas foram removidas e o extrato foi coletado em tubo de vidro, por gravidade. O extrato coletado foi submetido a extração homogênea líquido-líquido e 1 µL foi injetado no GC-ECD. As recuperações obtidas pelo método foram de 39,1 a 85%.

Moliner-Martinez *et al.*, 2009 [45], desenvolveram um método miniaturizado com base na DMFS e na microextração em fase sólida (SPME, do inglês, *solid phase microextraction*) para análise de agrotóxicos organoclorados e éteres

difenil polibromados em mexilhões e berbigão (molusco) por cromatografia gasosa com detecção de captura de elétrons (GC-ECD). A melhor condição obtida foi com 0,1 g de amostra liofilizada, 0,4 g de C₁₈ homogeneizados por 5 min, e 0,1 g de Florisil® como adsorvente auxiliar, eluidos com 1,2 mL de acetonitrila. O procedimento de pré-concentração SPME consistiu numa fibra de PDMS-DVB que foi imersa nos extratos durante 45 min sob agitação contínua. Os analitos foram diretamente injetados através da fibra (tempo desorção 2 min) em um sistema CG-ECD. As recuperações obtidas foram de 55 a 130%.

A Tabela 3 resume os trabalhos descritos.

Tabela 3: Aplicação da dispersão da matriz em fase sólida para determinação de agrotóxicos e outras substâncias em pescado.

Referência	Matriz, massa	Analitos	Adsorvente	Col. Aux.	Amostra: adsorvente	Solvente de eluição	Técnica
Shen <i>et al.</i>, 2016	Tecido de peixe, 10 mg liofilizado	Antibióticos sulfonamidas	HBL	-	1:2	20 µL (MeOH:H ₂ O:amônia)	LC-MS/MS
Pan <i>et al.</i>, 2015	Tecido de peixe, 2 g	Antibióticos	C ₁₈	-	2:3	10 mL (ACN:H ₂ O, 50:50)	UPLC-MS/MS
Cela-Pérez <i>et al.</i>, 2015	Tecido de peixe, 0,2 g	Derivados da ATP	Polímero molecular	Polímero molecular	1:2	2 mL n-hexano	UPLC-PDA
Chen <i>et al.</i>, 2014	Tecido de peixe, 1 g liofilizado	Retardantes de chama clorados	Sílica gel	Florisil®	1:2	20 mL n-hexano	GC-MS
Tao <i>et al.</i>, 2014	Peixe (músculo + pele); camarão 1 g	Antibióticos	C ₁₈	-	1:2	AcEt:ACN:NH ₄ OH 25% (10:88:2)	LC-MS/MS
Caldas <i>et al.</i>, 2013	Fígado de peixe 0,2 g e hepatopâncreas de caranguejo 0,5 g	Agrotóxicos	C ₁₈	-	1:5 (peixe) 1:2 (caranguejo)	5 mL ACN	GC-MS
Rezaei <i>et al.</i>, 2011	Tecido de Peixe 0,1 g	Agrotóxicos organoclorados	C ₁₈	Florisil®	1:4	1,5 mL ACN	GC-ECD
Moliner-Martinez <i>et al.</i>, 2009	Mexilhão e molusco 0,1 g liofilizado	Agrotóxicos e éteres	C ₁₈	Florisil®	1:4	1,2 mL ACN	GC-ECD

Onde ACN refere-se a acetonitrila; MeOH: Metanol e AcEt: Acetato de Etila. *Coluna auxiliar (purificação do extrato).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia para avaliação de resíduos de agrotóxicos em tecido muscular de tilápia (*Oreochromis niloticus*), utilizando a técnica de extração de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS).

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar os agrotóxicos que podem estar presentes no cultivo da tilápia;
- Otimizar as condições cromatográficas para análise simultânea dos agrotóxicos;
- Desenvolver uma metodologia de extração por DMFS, utilizando biocarvão como adsorvente dispersante;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar o método à amostra real.

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Acetonitrila grau HPLC (J.T Baker), Acetato de Etila grau HPLC (J.T Baker); Água ultrapurificada Milli-Q (Millipore Corporation), Lã de vidro silanizada (Hexis Científica), Sílica-gel 70-230 mesh (Hexis Científica), Alumina Neutra 50-200 µm (Sorbent Technologies), Florisil 100-200 mesh (J.T Baker), C₁₈ 200-400 mesh (Sigma-Aldrich), Sulfato de Sódio Anidro (Synth); biocarvão de coco (450°C). Os adsorventes não foram submetidos ao processo de ativação/desativação.

3.2 Padrões certificados dos agrotóxicos

Aldrin (Institute of Organic Industrial Chemistry, EUA), Ametrina (Riedel-de Haën, Alemanha), Bromopropilato (Riedel-de Haën, Alemanha), Bromuconazol (Fluka, Suíça), Cipermetrina (Fluka, Suíça), Clorpirifós (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemanha), Clorprofam (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemanha), Coumafós (AccuStandard, EUA), Esfenvalerato (Fluka, Suíça), Etiona (Fluka, Suíça), Permetrina (Fluka, Suíça), Pirimicarbe (Fluka, Suíça), Pirimifós Metílico (AccuStandard, EUA), Procimidona (AccuStandard, EUA), Vinclozolina (Fluka, Suíça), com 99,999% de pureza.

3.3 Equipamentos

Evaporador rotatório (Fisatom 802D);

Balança analítica (Mettler Toledo AL 204);

Sistema para SPE *vacuum manifold* (Varian, Walnut Creek, CA, EUA);

Cromatógrafo a gás da marca Shimadzu (Quioto, Japão) modelo GC-2010Plus, acoplado ao espectrômetro de massas modelo TQ-8040, injetor AOC5000Plus e coluna capilar SBL - 5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano; 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 µm; Supelco, EUA).

3.4 Obtenção e preparo da amostra

Uma tilápia de 900 g foi adquirida num tanque de distribuição no município de Itabaiana, Sergipe. No Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes, na Universidade Federal de Sergipe, foi separado o músculo do peixe (parte comestível) das vísceras, da pele e da espinha com auxílio de uma faca de aço inoxidável previamente esterilizada e de uma pinça igualmente limpa.

Com auxílio de um processador portátil previamente lavado, o filé foi homogeneizado e embalado em pequenas porções individuais de 0,2500 g ± 0,0005 g, em papel alumínio, e armazenado sob refrigeração a -5°C.

3.5 Preparo das soluções padrão dos agrotóxicos

A partir dos padrões sólidos de agrotóxicos, foram preparadas soluções estoque individuais em concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. Dessas, foram preparadas soluções intermediárias conjuntas de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Soluções conjuntas de trabalho de diferentes concentrações em acetonitrila foram preparadas para experimentos de extração por DMFS das amostras fortificadas.

A soluções foram utilizadas por no máximo 15 dias.

3.6 Condições cromatográficas de análise

As condições cromatográficas foram: temperaturas do injetor no modo splitless (250°C), a temperatura da interface (280°C), a temperatura da fonte de ionização (250°C) e gás de arraste hélio (99,999%) com vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. A programação do forno: temperatura inicial de 80°C (1,0 min); taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até 280°C (5,0 min) e solvente delay de 5 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo MRM (monitoramento de reações múltiplas) com ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV. O volume de injeção foi de $1 \mu\text{L}$. Os bancos de dados foram NIST e WILEY. O tempo total de análise foi de 26 min.

Para o modo SCAN houve mudança na programação do forno: temperatura inicial de 80°C (1,0 min); taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até 280°C (10,0 min) e solvente delay de 5 min. E o tempo total de análise foi de 31 min.

3.7 Fortificação da amostra

- Para amostras fortificadas utilizadas nos testes de recuperação, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de solução padrão dos agrotóxicos de concentração adequada à 0,25 g de tecido muscular triturado, e foi aguardado 30 minutos até a evaporação do solvente e interação dos agrotóxicos com a matriz.

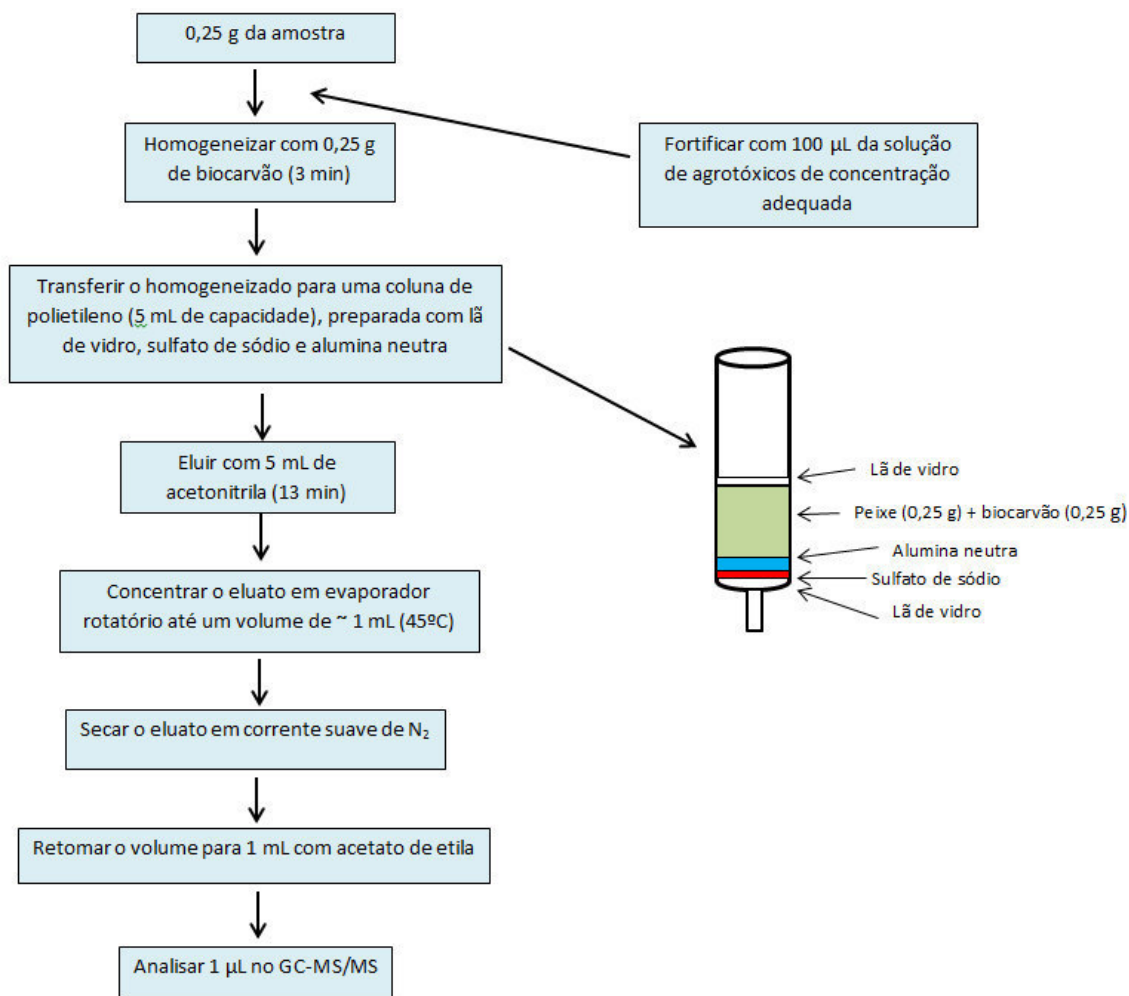
3.8 Procedimento de extração por DMFS

O procedimento de extração foi realizado nas seguintes etapas:

- 0,25 g do filé triturado da tilápia foi pesado;
- 0,25 g de adsorvente biocavão de coco foi pesado;
- O peixe foi homogeneizado com o adsorvente por 3 minutos utilizando um almofariz e pistilo;
- O cartucho de extração foi previamente preparado com lã de vidro, sulfato de sódio anidro (0,5 g) e alumina neutra (0,5 g);
- O conteúdo do almofariz foi transferido para o cartucho de extração;
- O cartucho foi eluído com 5 mL de acetonitrila, usando o sistema *Vacuum Manifold*, em fluxo constante, durante 13 min, recolhendo o eluato em um balão de fundo redondo;
- O eluato resultante foi evaporado em evaporador-rotatório (45°C e 80 rpm) até cerca de 1 mL;
- Posteriormente o conteúdo do balão de fundo redondo foi seco sob fluxo brando de N₂;
- O volume foi retomado para 1 mL em acetato de etila, realizando pelo menos 3 lavagens do balão;
- O extrato foi filtrado com membrana de nylon 0,20 µm e analisado 1 µL por CG-MS/MS.

A Figura 3 mostra as etapas do procedimento de extração baseado na técnica DMFS.

Figura 3: Etapas envolvidas no procedimento de extração de agrotóxicos em tecido de peixe.



3.9 Obtenção do biocarbão de coco

O biocarbão de coco foi obtido e caracterizado conforme descrito na referência [53].

Para a caracterização desse material foram feitas análises de IV (espectroscopia na região do infravermelho); MEV (microscopia eletrônica de varredura); área superficial pelo método BET e análise elementar CHN.

Através da análise IV, foi possível detectar a presença de diferentes grupos funcionais, importantes para a adsorção simultânea de diferentes compostos com diferentes polaridades.

A microscopia eletrônica mostra a morfologia do biocarbão, expondo a porosidade do material, onde foram encontrados muitos poros bem definidos. A

boa porosidade em harmonia com a vasta área superficial encontrada pelo método BET, de $399,9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, garantem a capacidade de adsorção do material.

Os estudos de análise elementar mostram teor de carbono de 67,46% atestando a eficiência da pirólise do material.

3.10 Limpeza de materiais

A lavagem de vidraria seguiu o procedimento descrito abaixo:

- Enxágue com água corrente duas vezes;
- Lavagem com solução de detergente neutro 5% (v/v);
- Enxágue com água corrente até a completa retirada da solução de detergente;
- Enxágue com água destilada;
- Enxágue com acetona;
- Secagem em estufa a 100°C (exceto as vidrarias volumétricas).

3.11 Descarte de resíduos

As soluções descarte de agrotóxicos foram transferidas para frascos de vidro e armazenadas no laboratório, enquanto os solventes utilizados na lavagem de material foram colocados em recipientes de descarte de solvente, identificadas para solventes clorados e não clorados para posterior destinação apropriada por empresa responsável.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento da metodologia ora proposta neste trabalho por DMFS e GC-MS/MS, a princípio foram otimizadas as condições cromatográficas para análise simultânea dos agrotóxicos selecionados, seguido dos experimentos de bancada para a seleção do método mais eficiente de *clean up* e extração para a amostra de tilápia.

4.1 Otimização das condições cromatográficas de análise

As soluções padrão individuais dos agrotóxicos em acetato de etila, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram analisadas no GC-MS/MS, no modo varredura linear (SCAN) para obtenção dos tempos de retenção e fragmentos. Os parâmetros de tempo de retenção e fragmentos (m/z) obtidos no modo SCAN foram usados na criação do método MRM (monitoramento de reações múltiplas) para a quantificação dos agrotóxicos em tilápia.

A Tabela 4 mostra os tempos de retenção e os fragmentos representativos (m/z) obtidos.

Tabela 4: Tempos de retenção e fragmentos representativos dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxicos	Tempo de retenção (min)	Fragmentos (<i>m/z</i>)
Clorprofam	12,96	127, 65*
Pirimicarbe	14,92	166, 55*
Vinclozolina	15,47	178, 115*
Ametrina	15,68	227, 185*
Pirimifós Metílico	15,96	290, 125*
Clorpirifós	16,36	197, 169*
Aldrin	16,55	263, 192*
Procimidona	17,44	283, 96*
Etiona	19,08	231, 129*
Bromuconazol 1	20,72	173, 145*
Bromopropilato	20,78	341, 183*
Bromuconazol 2	21,17	173, 145*
Permetrina 1	22,66	183, 168*
Coumafós	22,83	183, 168*
Permetrina 2	22,95	362, 109*
Cipermetrina	23,96	163, 127*
Esfenvalerato	25,61	125, 89*

*Fragmento de quantificação.

4.1.1 Criação do método MRM

Para avaliação do potencial de recuperação de cada adsorvente testado, um método de análise no modo MRM (monitoramento de razões múltiplas) foi criado. Para tanto, alguns passos foram seguidos:

Primeiramente foi feita a aquisição de dados (fragmentos e tempo de retenção) dos analitos, através da injeção, no modo SCAN, de uma solução padrão dos agrotóxicos na concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uma vez adquiridos esses dados, uma tabela foi criada, a *Compound table* (tabela com informações sobre os analitos, tais como nome do composto; fragmentos; tempo de retenção). A partir de então, foi realizada a determinação dos íons precursores para cada analito, permitindo a identificação dos compostos presentes na amostra.

Utilizando a função *Smart Database*, um banco de dados foi criado importando os dados obtidos no modo SCAN, o que facilita o desenvolvimento das condições de aquisição das futuras análises a partir das informações contidas nesse banco de dados.

Na próxima etapa, o método de *Product Ion Scan* é criado automaticamente a partir da função do *COAST (Creation of Automatic MRM or SIM table)*, onde os compostos da tabela serão medidos automaticamente pelo modo MRM, utilizando os íons precursores já escolhidos.

Finalmente, uma sequência de análises utilizando a função *MRM Optimization Tool* é criada para definir os parâmetros de análise no modo MRM, especialmente a escolha das transições e suas respectivas energias de colisão (CE). Para melhor otimização do método *MRM* é necessário prévio conhecimento da amostra em termos estruturais dos compostos presentes. A faixa de trabalho é de 0 a 60 V. Nessa etapa o volume de injeção e a repetição de injeção para cada vial é definido, nesse trabalho foi usado o volume de $1 \mu\text{L}$ injetado 1 vez.

A Tabela 5 mostra as transições e respectivas energias de colisão dos analitos estudados.

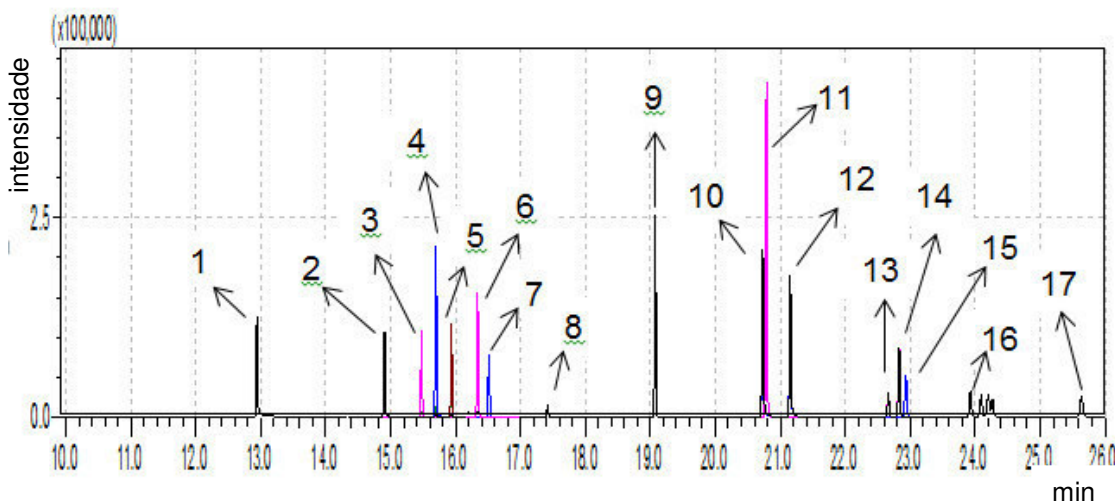
Tabela 5: Fragmentos e energias de colisão dos analitos no modo MRM.

Agrotóxicos	Start time – End time (min)	Fragmentos (m/z) / transições	Energia de colisão (CE)
Clorprofam	11,59 – 13,37	127 > 65	24,00
Pirimicarbe	14,35 – 16,16	166 > 55	21,00
Vinclozolina	14,35 – 16,16	178 > 115	21,00
Ametrina	14,35 – 16,16	227 > 185	9,00
Pirimifós Metílico	14,35 – 16,16	290 > 125	24,00
Clorpirifós	16,16 – 16,99	197 > 169	18,00
Aldrin	16,16 – 16,99	263 > 192	36,00
Procimidona	16,99 – 18,27	283 > 96	12,00
Etiona	18,27 – 19,92	231 > 129	24,00
Bromuconazol 1	19,92 – 21,94	173 > 145	18,00
Bromopropilato	19,92 – 21,94	341 > 183	18,00
Bromuconazol 2	19,92 – 21,94	173 > 145	18,00
Permetrina 1	21,94 – 23,48	183 > 168	18,00
Coumafós	21,94 – 23,48	183 > 168	18,00
Permetrina 2	21,94 – 23,48	362 > 109	18,00
Cipermetrina	23,48 – 24,85	163 > 127	9,00
Esfenvalerato	24,85 – 26,01	125 > 89	21,00

4.1.2 Avaliação do método MRM

Visando a separação ideal entre os analitos estudados, uma solução conjunta com os 15 padrões dos agrotóxicos em acetato de etila na concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi analisada no GC-MS/MS no modo de monitoramento seletivo de reações - MRM. Não houve co-eluição das espécies estudadas. A Figura 4 mostra o cromatograma.

Figura 4: Cromatograma por monitoramento de reações múltiplas da solução padrão conjunta ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos agrotóxicos: (1) clorprofam; (2) pirimicarbe; (3) vinclozolina; (4) ametrina; (5) pirimifós metílico; (6) clorpirifós; (7) aldrin; (8) procimidona; (9) etiona; (10 e 12) bromuconazol; (11) bromopropilato; (13 e 15) permetrina; (14) coumafós; (16) cipermetrina e (17) esfenvalerato. Para condições cromatográficas de análise, ver Tópico 3.6.



Após a definição das condições cromatográficas ideais para análise simultânea dos agrotóxicos, os experimentos para otimização do método de extração foram iniciados, onde foram avaliados diferentes parâmetros.

4.2 Otimização do método de extração

A otimização do método de extração visa avaliar o potencial do processo de isolamento dos agrotóxicos estudados com base nos testes de recuperação, bem como o potencial de limpeza dos extratos a partir de investigação das diferentes variáveis aplicadas ao método.

O estudo de recuperação foi feito fortificando-se a matriz com solução dos agrotóxicos, de concentração conhecida, seguida das etapas de extração necessárias à recuperação dos analitos (três replicatas foram analisadas para cada nível de fortificação). A porcentagem recuperada foi calculada pela equação 1 [57]:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor adicionado}} \times 100$$

Equação 1

Onde “valor obtido” e “valor adicionado” correspondem ao valor das áreas integradas dos picos cromatográficos originados dos extratos da amostra controle e da amostra fortificada respectivamente. Valores de recuperação da faixa de 70 a 120% ± 20% para matrizes complexas são aceitáveis [49].

Uma série de parâmetros na dispersão da matriz em fase sólida devem ser observados a fim de alcançar a melhor eficiência e seletividade da técnica. Dentre esses podem-se citar: o suporte adsorvente (dispersante) e a sua quantidade, o tempo de homogeneização amostra-adsorvente, a quantidade e tipo de adsorvente auxiliar, o solvente de eluição e volume usado [10, 46]. Esses fatores contribuem diretamente no desempenho do método aplicado.

4.2.1 Escolha do solvente de eluição

A escolha do eluente é determinante para a eficiência da técnica de extração. O solvente escolhido como eluente deve solubilizar o analito que está na matriz e não interagir com os interferentes. Por isso, a escolha do solvente deve levar em conta as propriedades físico-químicas dos analitos de interesse bem como da natureza da matriz. Como não existe um solvente universal para todas as matrizes/analitos, um estudo preliminar é de fundamental importância [10].

Partindo do princípio que semelhante dissolve semelhante, analitos mais polares devem ser tratados com solventes polares, analogamente, para analitos apolares é necessário um solvente de caráter apolar. Dessa forma, o

que se busca é uma eluição seletiva, de modo que os compostos de interesse sejam eluídos e outros componentes da matriz fiquem retidos na coluna [46].

Acetonitrila, acetato de etila e acetona são solventes muito usados na determinação de pesticidas em diferentes matrizes. Dentre estes, a acetonitrila é um solvente que apresenta grande seletividade de extração, pois extrai muito menos compostos lipofílicos quando comparada a acetona e acetato de etila [31].

Rezaei *et al.* [32], utilizaram acetonitrila como solvente de eluição em um método miniaturizado da DMFS assistido por extração com ultrassom para determinação de agrotóxicos organoclorados em peixe. Caldas *et al.* [33] obtiveram os melhores resultados na extração de agrotóxicos em peixe utilizando 5 mL de acetonitrila como solvente de extração utilizando a DMFS assistida por vórtex como procedimento de extração.

Assim, a acetonitrila foi o solvente utilizado nos testes de recuperação desse trabalho.

4.2.2 Seleção do adsorvente dispersante e de limpeza

O adsorvente dispersante é o principal parâmetro a ser definido na técnica de extração DMFS, pois a dispersão/homogeneização da matriz no suporte adsorvente é um diferencial da técnica. Os adsorventes comerciais mais utilizados são: alumina neutra (Al_2O_3), sílica (SiO_2)_x, Florisil® (MgSiO_3), cianopropil [$(\text{SiO}_2)_x\text{-(CH}_2)_3\text{CN}$] e C_{18} [10]. Novos materiais como nanotubos de carbono (MWCNTs, do inglês Multiwalled Carbon Nanotubes), polímeros metal-orgânicos (MOFs), polímeros de impressão molecular (MIPs, do inglês molecularly imprinted polymers), areia e biomassa têm sido avaliados como materiais alternativos (adsorventes) na DMFS [46].

Nesse trabalho foram testados os adsorventes alumina neutra (Al_2O_3), sílica (SiO_2)_x, Florisil® (MgSiO_3), C_{18} e biocarvão de coco. Testes de eficiência do método de extração foram realizados no nível de concentração $5 \mu\text{g g}^{-1}$. Os valores de recuperação nos extratos foram calculados a partir de solução de

comparação no mesmo nível de fortificação feita no extrato da matriz (ver Ítem 4.2).

- *Proposta 1:* Sílica como adsorvente dispersante e C₁₈ como adsorvente de limpeza (cocoluna).

Chen *et al.*, 2014 [43], utilizaram sílica-gel como adsorvente na determinação de retardantes de chama em tecido de peixe na proporção matriz:adsorvente (1:2).

Utilizando 0,25 g de amostra, 0,5 g de adsorvente, 0,5 g de adsorvente auxiliar, 0,5 g de sulfato de sódio como agente secante, e eluição com acetonitrila (5 mL), o extrato obtido mostrou-se relativamente limpo, com baixa intensidade (Figura 5), porém a recuperação apresentou um intervalo abaixo do desejado: 57,32 – 81,84% ± 4,63% (Figura 6). Isso pode ser explicado porque a sílica apresenta, em geral, um poder de adsorção reduzido em comparação com outros adsorventes como a alumina, por exemplo [47]. O uso do material C₁₈ tem sido reportado amplamente na literatura por sua acentuada eficiência na limpeza de extratos, removendo interferentes apolares, como lipídeos, por exemplo [32, 33, 41, 44, 45].

Figura 5: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de tilápia (0,25 g) + adsorvente sílica (0,5 g) e coluna auxiliar C₁₈ (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.

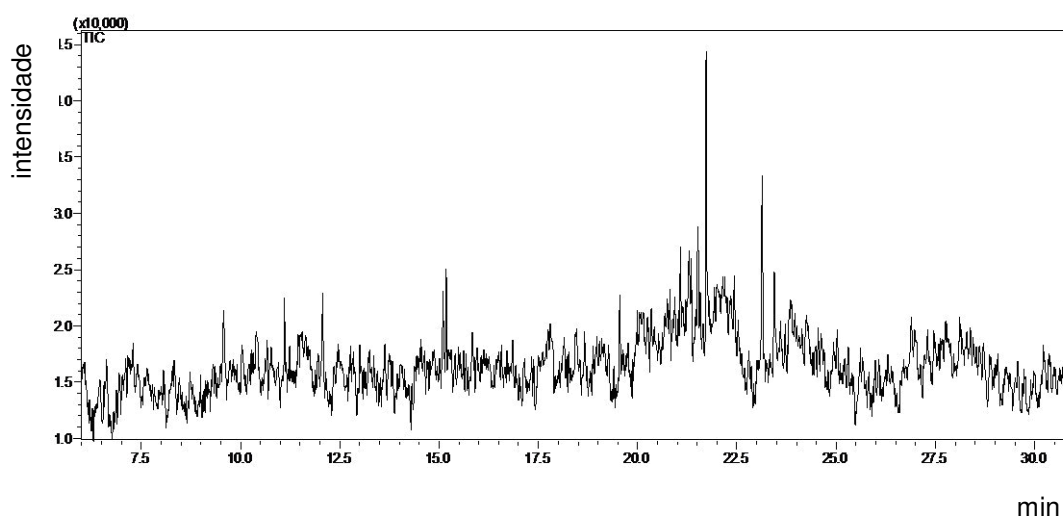
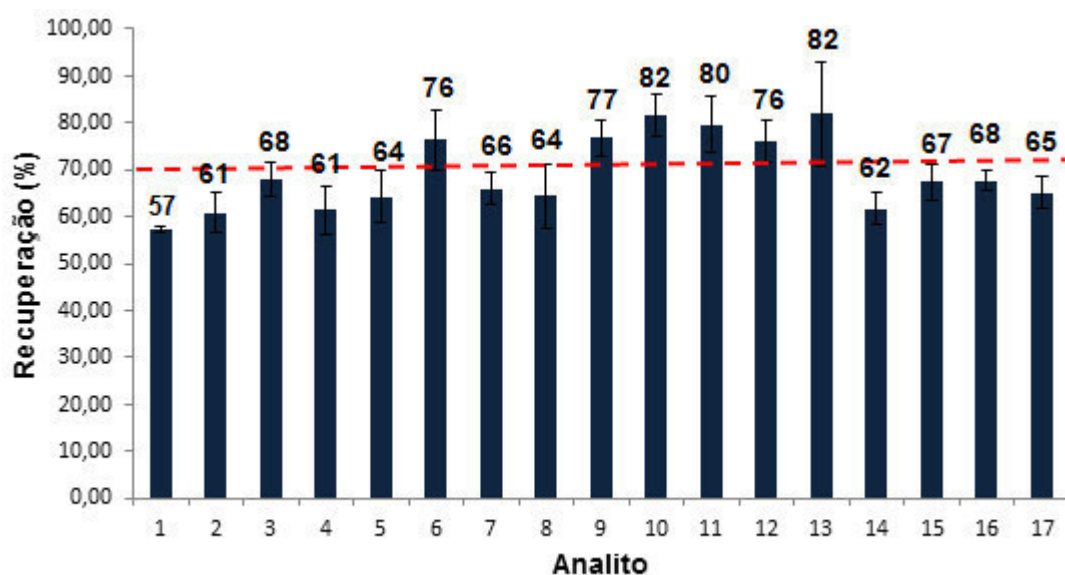


Figura 6: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de tilápia (Proposta 1).

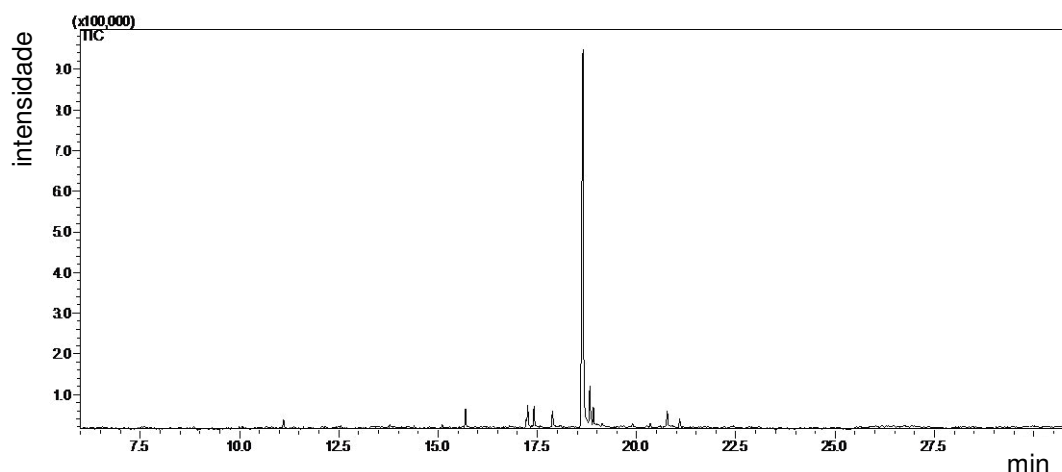


Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

- *Proposta 2:* Florisil® como adsorvente dispersante e C₁₈ como adsorvente de limpeza.

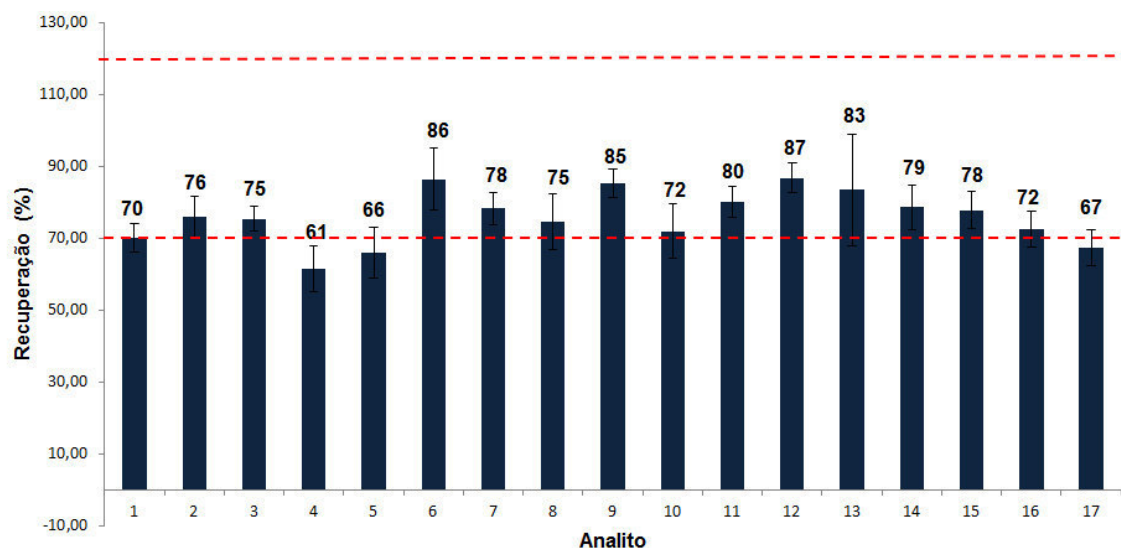
Nesse procedimento foi testado o uso de Florisil® e C₁₈, adsorventes com polaridades diferentes na tentativa de se obter um extrato da matriz com poucos interferentes, uma vez que os analitos apresentam polaridades variadas, de moderadamente polar a não polar [58] (ver propriedades na Tabela 2). As quantidades de adsorvente e solvente de extração foram mantidas conforme a proposta 1. O sistema ora proposto registrou um extrato com um composto acentuado, conforme padrão de fragmentação obtido na biblioteca NIST, trata-se de um ácido graxo (Figura 7).

Figura 7: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de tilápia (0,25 g) + adsorvente Florisil® (0,5 g) e coluna auxiliar C₁₈ (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver tópico 3.6.



Quanto ao teste de eficiência, feito em triplicata, a recuperação obtida nesse procedimento foi de $61,5 - 86,88\% \pm 6,13\%$, com um valor de mínimo fora do limite aceitável pela literatura de 70%, porém com uma faixa de recuperação melhor que a Proposta 1. A Figura 8 mostra o gráfico dos valores de recuperação dos analitos.

Figura 8: Eficiência de extração dos agrotóxicos em tecido muscular de tilápia (Proposta 2).



Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

- *Proposta 3:* Alumina neutra como adsorvente dispersante e C₁₈ como adsorvente de limpeza (cocoluna).

A alumina neutra possui polaridade similar à do Florisil®, porém características distintas como porosidade e área de superfície de adsorção muito maior [34]. Segundo Lanças, 2004 [48] a alumina neutra apresenta caráter anfótero, ou seja, pode interagir tanto com compostos ácidos como com básicos, sendo, portanto, indicada para análise multirresíduo, uma vez que os analitos-alvo possuem características distintas de acidez/basicidade (ver valores de pKa na Tabela 2) [58].

Sendo assim, nesse procedimento foi utilizada as mesmas quantidades que na Proposta 1, substituindo o adsorvente sílica pela alumina neutra. O sistema mostrou-se semelhante à Proposta 2 com relação à remoção de interferentes. Esse comportamento já era esperado devido à polaridade similar dos adsorventes (Figura 9), porém para o teste de eficiência descrito anteriormente, recuperações na faixa 70,52 – 99,1% ± 5,61% foram obtidas (Figura 10), tornando a Proposta 3 melhor que as Propostas 1 e 2.

Figura 9: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de tilápia (0,25 g) + adsorvente alumina neutra (0,5 g) e coluna auxiliar C₁₈ (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.

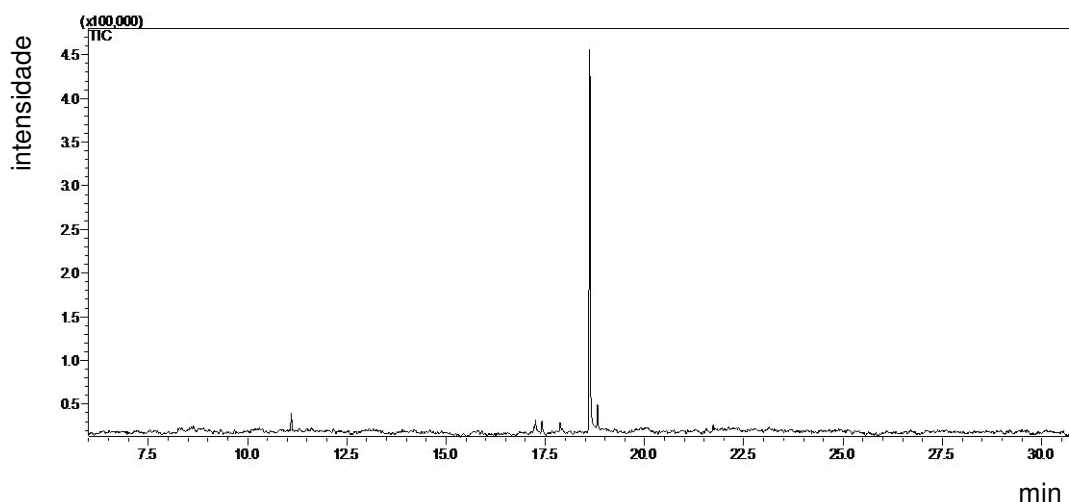
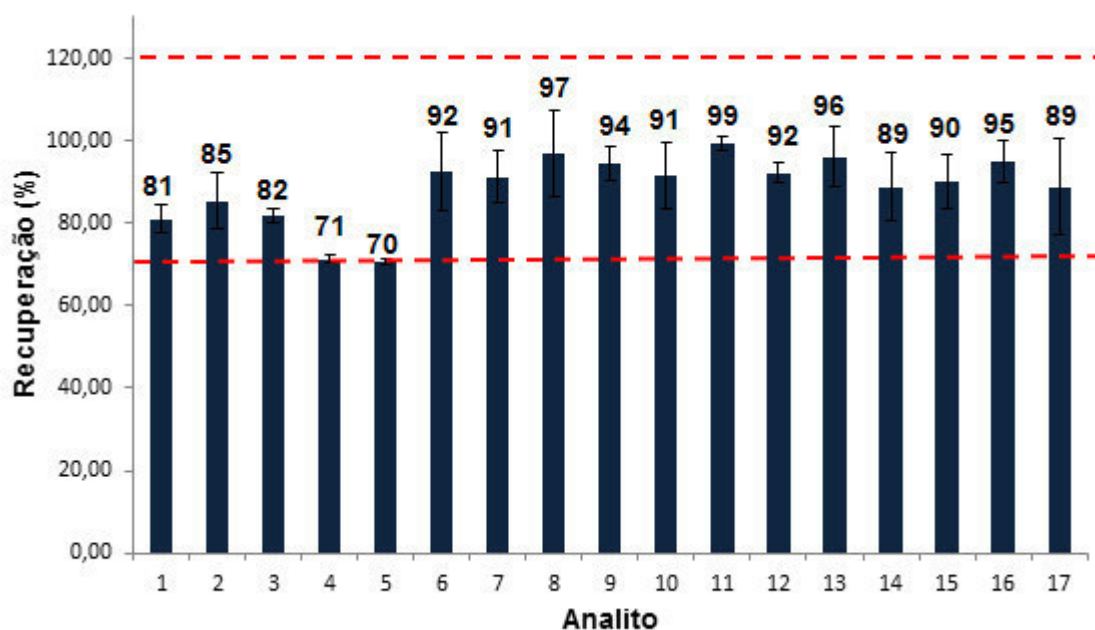


Figura 10: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de tilápia (proposta 3).



Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

- *Proposta 4:* C₁₈ como adsorvente dispersante e alumina como adsorvente de limpeza.

Visando melhorar a limpeza do extrato obtido na Proposta 3 (Figura 9), foram avaliadas condições descritas naquela proposta, porém C₁₈ foi utilizado como adsorvente dispersante e a alumina neutra foi usada como adsorvente auxiliar. Para o uso do C₁₈ como adsorvente dispersante, foi necessário 0,75 g ao invés de 0,5 g, que estava sendo usado nas Propostas 1, 2 e 3. Como o C₁₈ tem o menor tamanho de partícula entre os adsorventes testados e portanto a maior área superficial, como mostrado na Tabela 6 abaixo (quanto maior o mesh, menor a partícula), 0,5 g não foi suficiente para dar à mistura amostra/dispersante um aspecto pulverulento.

Tabela 6: Tamanho de partícula dos adsorventes usados no trabalho.

Adsorvente	Tamanho de partícula (mesh)
Alumina neutra	150
Sílica	70-230
Florisil	100-200
C₁₈	200-400

Alguns trabalhos são reportados na literatura utilizando o C₁₈ como adsorvente dispersante em DMFS para a matriz peixe [32, 41, 44], uma vez que o caráter apolar desse polímero proporciona a retenção eficiente de compostos lipídicos [26].

Na presente proposta (4) foi obtido um extrato mais limpo, porém a taxa de recuperação apresentou queda, provavelmente o uso de 0,75 g de C₁₈ como adsorvente dispersante aumentou a retenção dos analitos, diminuindo a concentração no extrato final. A recuperação obtida foi de 77,56 a 88,30% ± 4,70% (Figura 12). Apesar do decréscimo na recuperação comparado à Proposta 3, o valor obtido ainda se enquadra no que é aceito pela literatura. A Figura 11 mostra o perfil gerado por essa proposta.

Figura 11: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de tilápia (0,25 g) + adsorvente C_{18} (0,75 g) e coluna auxiliar alumina neutra (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.

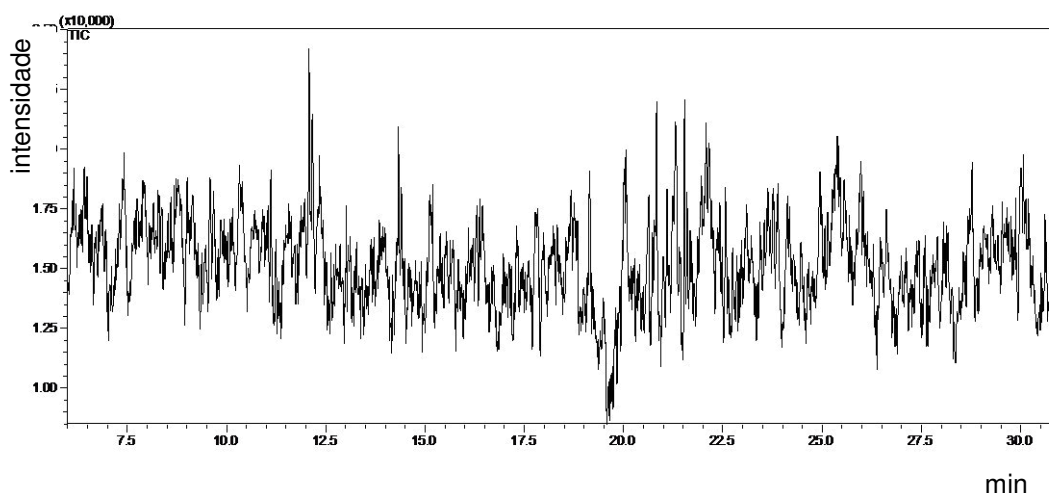
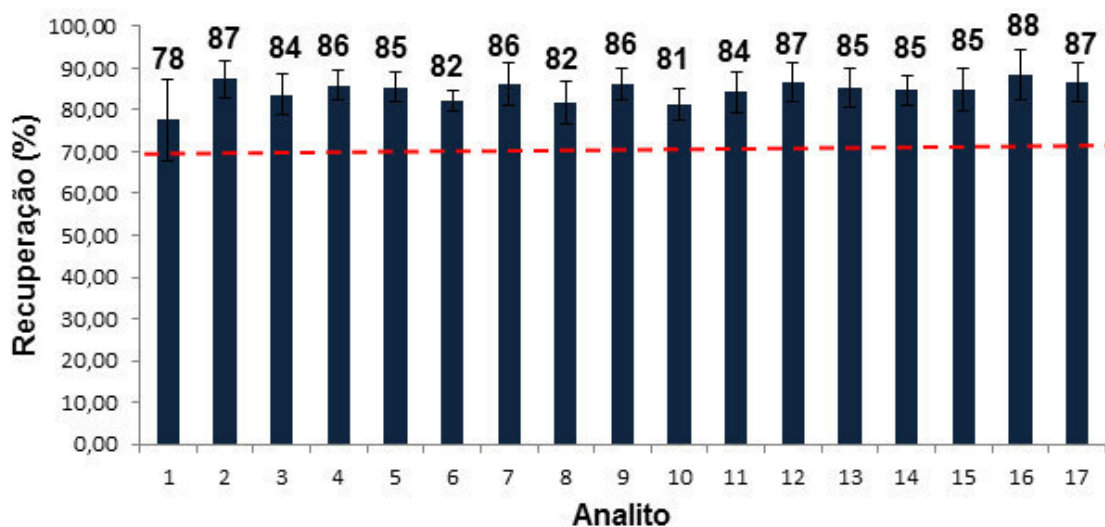


Figura 12: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de tilápia (Proposta 4).



Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

- *Proposta 5:* Alumina como adsorvente dispersante e biocarvão de coco como adsorvente de limpeza.

A busca por novos materiais adsorventes na técnica DMFS é uma constante [23], uma vez que os adsorventes comerciais muitas vezes apresentam custo elevado. Novos materiais com características adsorventes como o biocarvão, vem sendo testados [50, 60].

O biocarvão é um material refinado e de alta porosidade, rico em carbono e é produzido pela queima da biomassa (entre 300°C – 1000°C) sob atmosfera pobre em oxigênio. Devido as suas características físico-químicas, é eficiente na retenção de nutrientes e água quando aplicado como fertilizante no solo e tem considerável capacidade de adsorção frente a contaminantes orgânicos [50, 51].

A literatura relata uso do biocarvão na adsorção de contaminantes principalmente na técnica de extração SPE e em água [52]. Entretanto, a aplicação de biocarvão como adsorvente em DMFS é limitada. Diante desse contexto, a Proposta 5 visa testar o biocarvão e contribuir com a literatura fornecendo uma nova aplicação para esse material.

Nesse procedimento foi testado o potencial de limpeza do extrato utilizando a alumina neutra (dado seu êxito de recuperação na Proposta 3) como adsorvente e biocarvão de coco como coluna auxiliar. As quantidades foram mantidas conforme descrito na Proposta 1. O extrato apresentou algumas impurezas (Figura 13) e a recuperação obtida foi de 77,99 a 98,10% \pm 4,80% (Figura 14), demonstrando eficiência satisfatória.

Figura 13: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de tilápia (0,25 g) + adsorvente alumina neutra (0,5 g) e coluna auxiliar biocarvão de coco (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.

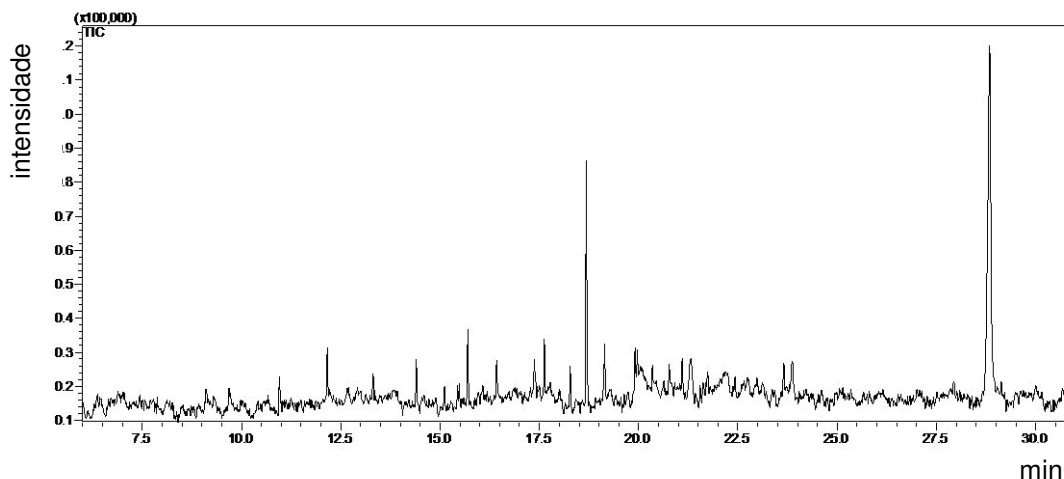
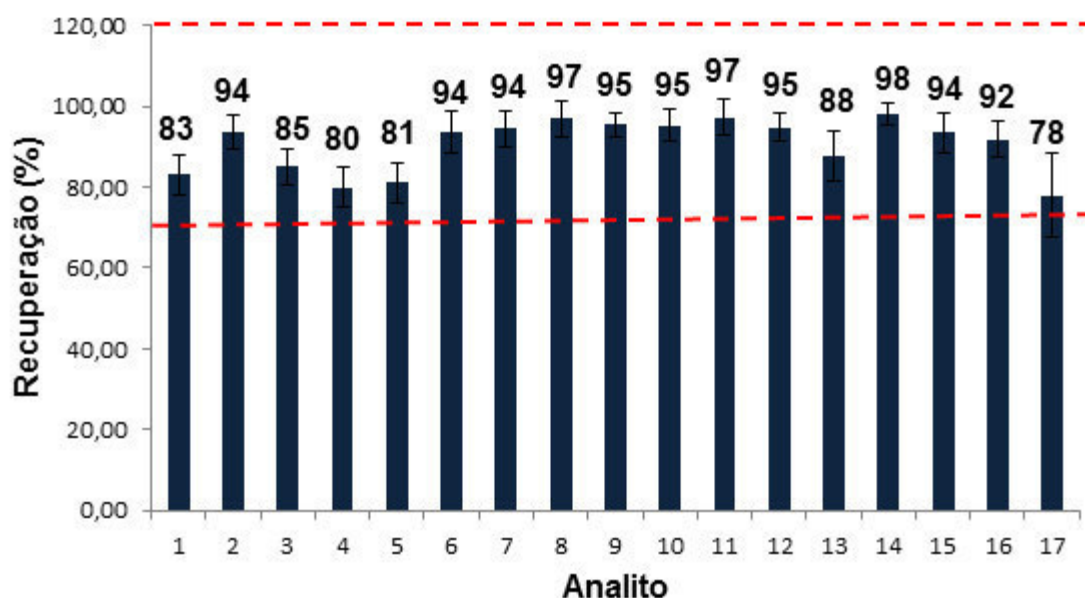


Figura 14: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de tilápia (Proposta 5).



Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

Após as propostas acima, o biocarvão de coco foi testado como adsorvente dispersante a fim de avaliar sua eficiência.

- *Proposta 6:* Biocarvão de coco como adsorvente dispersante sem adsorvente auxiliar de limpeza.

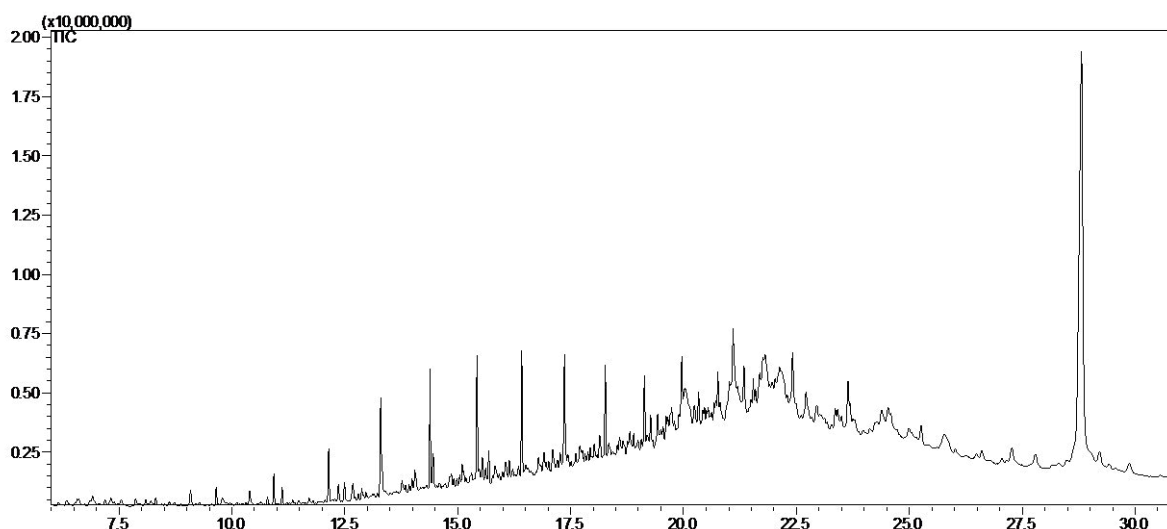
Para testar a eficiência do biocarvão de coco como adsorvente dispersante foi utilizado 0,25 g de biocarvão e 0,25 g da matriz (1:1). A mistura matriz/adsorvente mostrou um aspecto desejável, onde o adsorvente foi capaz de pulverizar a quantidade de amostra da proposta, conforme mostrado na Figura 15.

Figura 15: Aspecto da mistura peixe/biocarvão de coco após homogeneização.



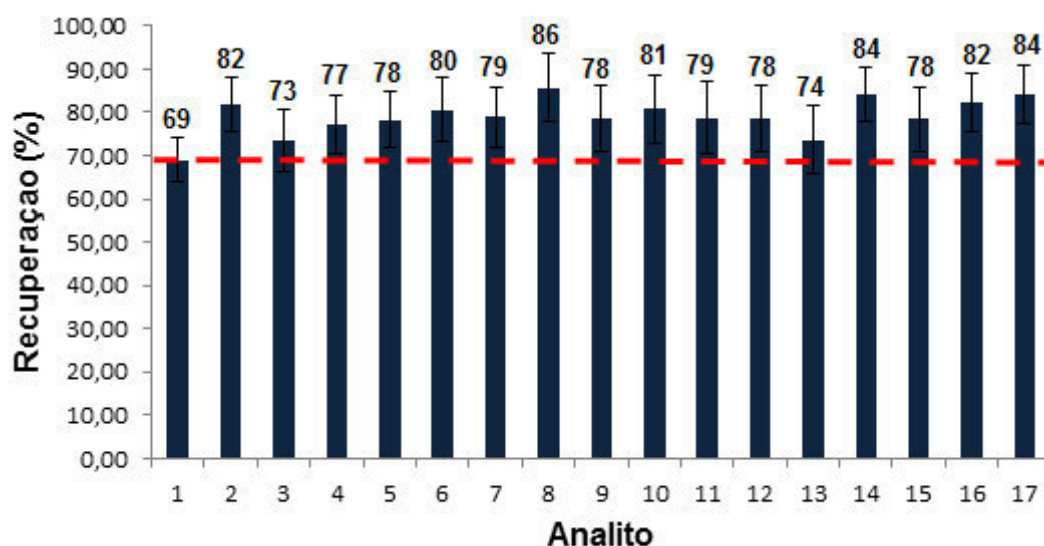
Após a extração, foi observado um extrato com impurezas em intensidade acentuada (Figura 16), atestando a necessidade de experimentos utilizando adsorvente auxiliar para limpeza do extrato.

Figura 16: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de tilápia (0,25 g) + adsorvente biocarvão de coco (0,25 g) eluído com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.



O teste de recuperação mostrou eficiência em que apenas 1 analito (Aldrin) ficou um pouco abaixo do valor mínimo desejado de recuperação (Figura 17). Isso pode ser explicado pelo acentuado efeito matriz que provavelmente ocorre nessa proposta, uma vez que o extrato final apresenta muitas impurezas conforme mostrado na Figura 16 acima.

Figura 17: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de tilápia (Proposta 6).



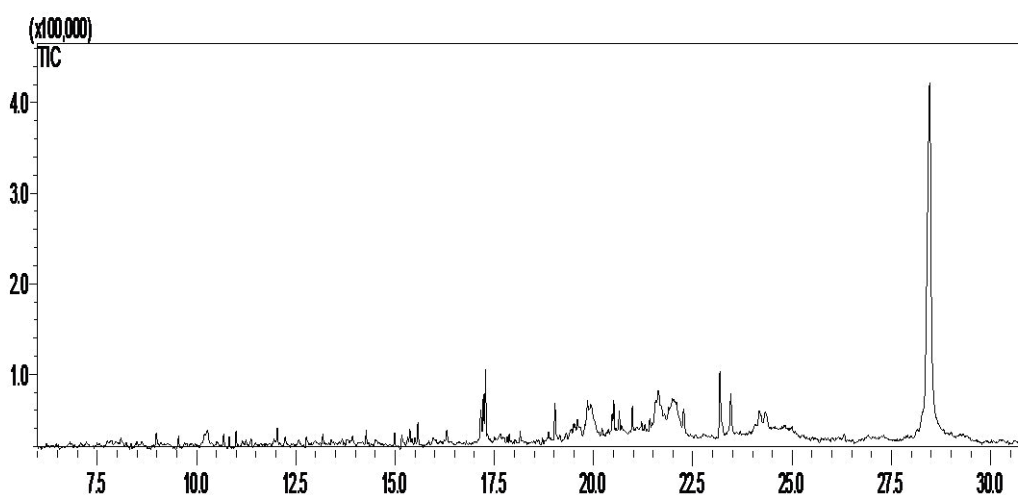
Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

- *Proposta 7:* Biocarvão de coco como adsorvente dispersante e alumina como adsorvente de limpeza.

Para minimizar o efeito matriz ocorrido na Proposta 6, e aumentar a faixa de recuperação, optou-se por uma nova proposta em que a alumina foi utilizada como adsorvente auxiliar. A alumina foi selecionada como adsorvente auxiliar uma vez que apresentou boas taxas de recuperação em comparação com outros adsorventes convencionais, conforme observado nas Propostas 1 a 4.

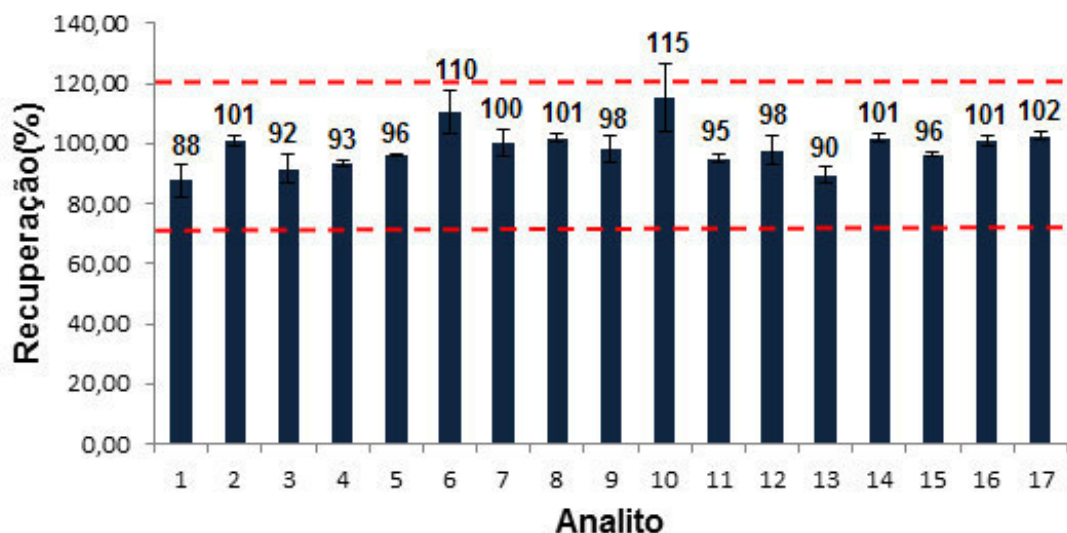
O cromatograma da corrente total de íons do extrato da Proposta 7 mostra uma queda de intensidade significativa, comparado com a Proposta 6 onde não foi usado adsorvente auxiliar, isso atesta a eficiência da alumina na limpeza do extrato, importante para preservar as condições de uso do equipamento.

Figura 18: Cromatograma da corrente total de íons do extrato do tecido muscular de Tilápia (0,25 g) + adsorvente biocarvão de coco (0,25 g) e coluna auxiliar alumina neutra (0,5 g) eluido com 5 mL de acetonitrila. Para condições cromatográficas, ver Tópico 3.6.



As recuperações obtidas na presente proposta apresentam boas taxas de recuperação, com valores dentro do estabelecido pela literatura para um bom método [49].

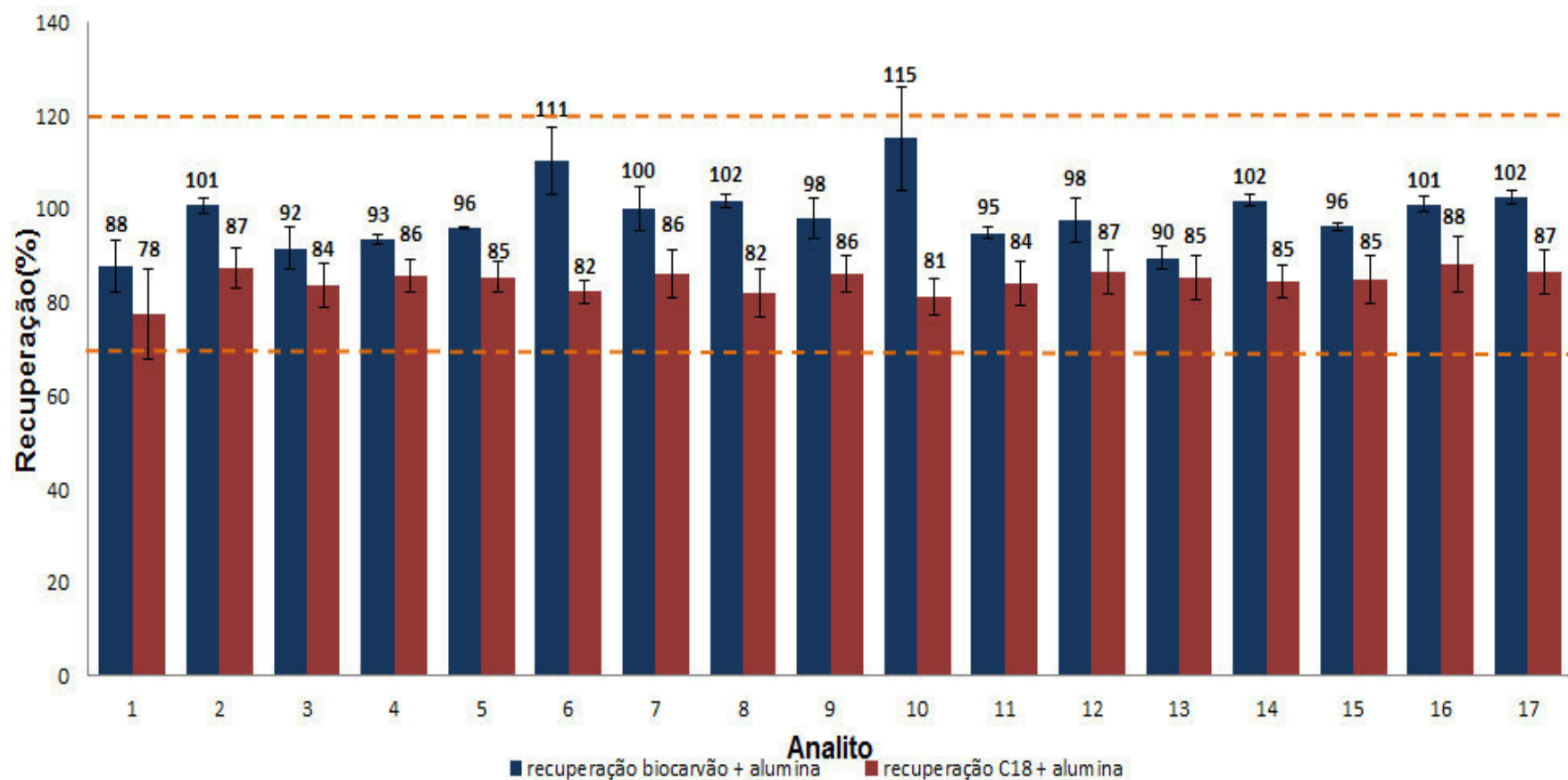
Figura 19: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia (Proposta 7).



Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

A fim de atestar a eficiência do biocarvão de coco como adsorvente em comparação com adsorventes convencionais utilizando a técnica de extração dispersão da matriz em fase sólida, pode-se comparar as propostas 4 e 7, em que o adsorvente auxiliar utilizado para ambas foi a alumina e o adsorvente dispersante foi o C₁₈ na Proposta 4 e o biocarvão de coco na Proposta 7. A Figura 20 mostra a comparação das duas propostas.

Figura 20: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia – comparação entre as propostas 4 e 7.



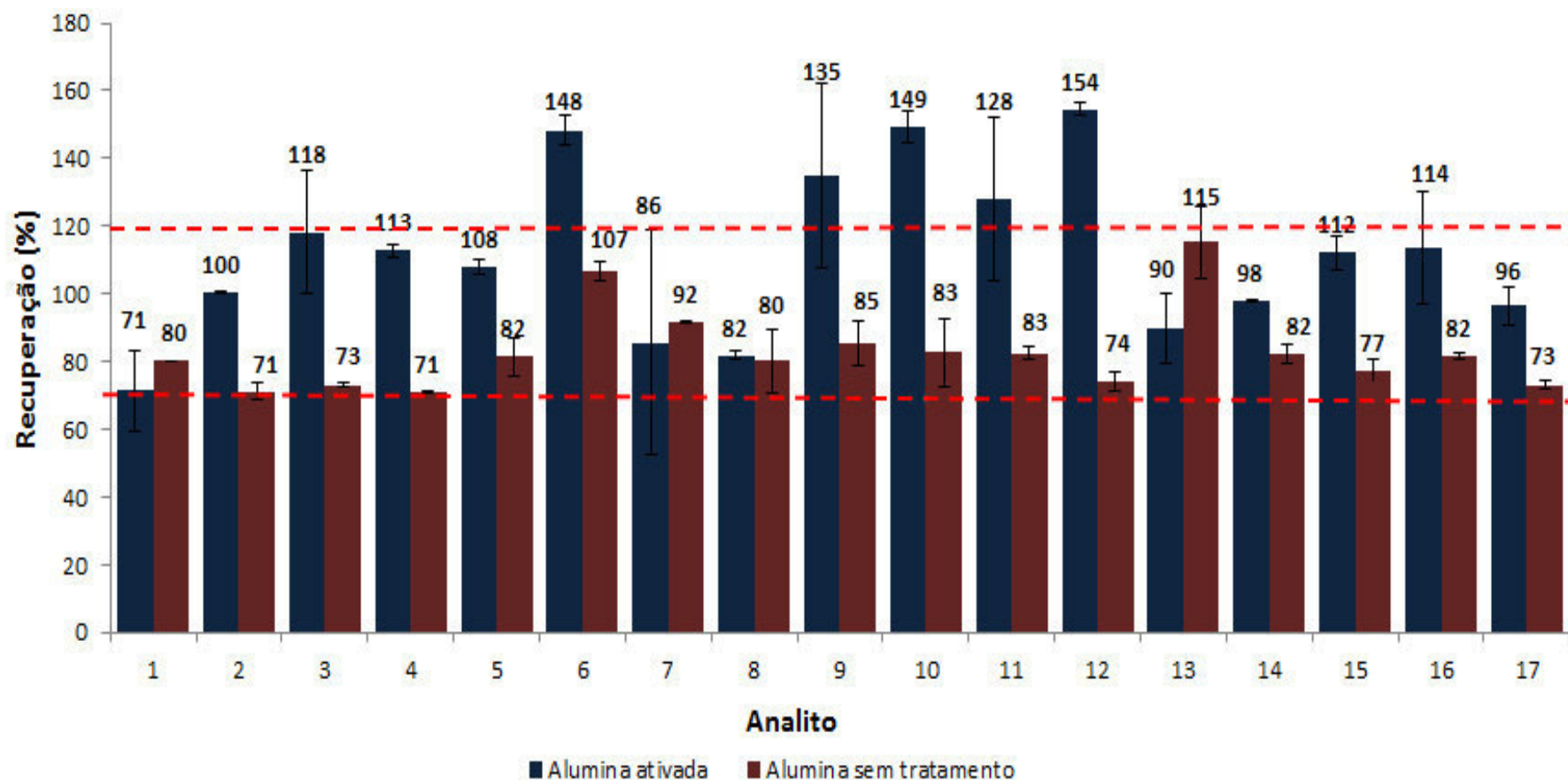
Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

Como observado, o biocarvão de coco apresentou resultados satisfatórios de recuperação para os agrotóxicos estudados, com valores dentro da faixa estabelecida pela literatura (70 – 120%), mostrando-se portanto um eficiente adsorvente para uso no processo de extração pela técnica de dispersão da matriz em fase sólida para os agrotóxicos estudados.

- *Proposta 8:* Biocarvão de coco como adsorvente dispersante e alumina ativada como adsorvente de limpeza.

Nesta proposta, a alumina neutra, utilizada como adsorvente de limpeza, foi ativada a 400° C, durante 4 horas apresentando atividade grau III (5%). O procedimento consistiu em adicionar 5% de água, em massa, a uma quantidade de alumina e manter sob agitação por 10 minutos [11]. Após a ativação, o procedimento de extração foi feito nas mesmas condições da Proposta 7. A Figura 21 mostra a comparação dos procedimentos utilizando a alumina sem tratamento e a alumina ativada (Propostas 7 e 8, respectivamente).

Figura 21: Eficiência de extração dos agrotóxicos de tecido muscular de Tilápia – comparação entre alumina ativada e sem tratamento, nas condições da Proposta 8.



Onde: 1-Aldrin; 2-Ametrina; 3-Bromopropilato; 4-Bromuconazol 1; 5-Bromuconazol 2; 6-Cipermetrina; 7-Clorpirifós; 8-Clorprofam; 9-Coumafós; 10-Esfenvalerato; 11-Etiona; 12-Permetrina 1; 13-Permetrina 2; 14-Pirimicarbe; 15-Pirimifós Metílico; 16-Procimidona; 17-Vinclozolina.

A partir da análise da Figura 21 acima é possível observar que os ensaios utilizando a alumina ativada causaram aumento da resposta cromatográfica, possivelmente pela acentuação do efeito matriz. De acordo com os dados auferidos, optou-se por efetuar a validação do método utilizando a alumina sem tratamento, conforme Proposta 7.

4.3 Validação do método analítico

Uma vez otimizado o método analítico para extração de pesticidas em tecido muscular de tilápia utilizando dispersão da matriz em fase sólida, o mesmo foi submetido a avaliação de diferentes parâmetros a fim de assegurar que será capaz de fornecer resultados representativos e confiáveis nas condições em que fora aplicado [67, 69]. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, cujos resultados são descritos a seguir:

4.3.1 Linearidade e sensibilidade

Para determinar a linearidade do método em estudo, curvas analíticas foram construídas a partir de soluções feitas dos padrões dos agrotóxicos em estudo nas concentrações 0,0025; 0,05; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetato de etila e no extrato da matriz. Após análise, as curvas foram construídas usando a relação entre a concentração e o sinal gerado de cada analito, as curvas construídas encontram-se no Apêndice. A Tabela 7 apresenta os valores do coeficiente de correlação (r) e as equações da reta obtidas a partir das curvas analíticas no solvente e na matriz de cada agrotóxico estudado por GC-MS, onde N representa o número de pontos da curva.

Tabela 7: Equações da reta das curvas analíticas dos 15 agrotóxicos no solvente e no extrato da matriz e seus coeficientes de correlação (r).

Agrotóxico	Curva no solvente			Curva no extrato da matriz		
	Equação da reta	N	r	Equação da reta	N	r
Aldrin	$y=146,5851+19423,3826x$	10	0,9993	$y=122,4761+18889,2522x$	10	0,9994
Ametrina	$y=-660,5859+49805,6498x$	10	0,9993	$y=544,9282+71548,1992x$	9	0,9999
Bromopropilato	$y=480,7627+109346,6849x$	10	0,9999	$y=1382,5641+137186,907x$	10	0,9991
Bromuconazol	$y=115,1972+84139,4413x$	10	0,9999	$y=599,8599+110950,1259x$	10	0,9996
Cipermetrina	$y=-38,0289+27353,2085x$	9	0,9999	$y=340,2587+31443,6173x$	10	0,9993
Clorpirifós	$y=-357,2799+61259,7939x$	10	0,9999	$y=788,3012+68573,1299x$	9	0,9996
Clorprofan	$y=-1166,1791+51499,5935x$	9	0,9989	$y=-377,8692+82011,5893x$	9	0,9998
Coumafós	$y=22,3880+46412,1316x$	9	0,9999	$y=411,4271+58795,9526x$	9	0,9995
Esfenvalerato	$y=-73,6385+39261,8978x$	9	0,9999	$y=391,6037+44202,0400x$	10	0,9993
Etion	$y=-909,8041+125662,4189x$	10	0,9996	$y=400,1772+172786,1613x$	10	0,9998

Tabela 7: continuação

Permetrina 1	$y=43,5715+18400,3588x$	10	0,9998	$y=264,2941+23213,0554x$	10	0,9994
Permetrina 2	$y=-945,5531+21584,7334x$	7	0,9981	$y=210,1152+45124,2734x$	10	0,9995
Pirimicarbe	$y=-1209,5577+82723,6925x$	10	0,9988	$y=194,7592+100528,8722x$	10	0,9998
Pirimifós Metílico	$y=-453,6162+50133,5598x$	10	0,9996	$y=171,8278+60906,6159x$	10	0,9997
Procimidona	$y=-70,6506+7683,4352x$	7	0,9996	$y=49,2975+9508,1566x$	9	0,9997
Vinclozolin	$y=-216,3214+15866,7699x$	9	0,9996	$y=167,5733+17561,9406x$	9	0,9978

Verifica-se, a partir da Tabela 7, que os coeficientes de correlação apontam para excelente resposta linear, uma vez que todos os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 e os órgãos regulamentadores brasileiros ANVISA e INMETRO aceitam coeficientes iguais a 0,99 e 0,90, respectivamente [36, 68].

Com relação à sensibilidade do método, esta foi analisada segundo os coeficientes angulares das curvas geradas, ou seja a inclinação da reta, onde quanto maior o coeficiente angular, mais sensível o método. O agrotóxico mais sensível ao método foi a Etiona e o menos sensível foi a Procimidona.

4.3.2 Seletividade

Uma maneira eficiente de determinar a seletividade de um método analítico é avaliando o efeito matriz, este por sua vez pode causar supressão ou aumento da resposta cromatográfica devido a alguns componentes da amostra que interferem no sinal cromatográfico gerado. [71-73]

Esse efeito pode ser avaliado pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas no extrato e no solvente, onde o valor da razão entre os coeficientes angulares da curva no solvente e no extrato da matriz quando superior a 1 indica um efeito matriz positivo, e quando inferior a 1 indica um efeito matriz negativo. [73]

A Tabela 8 mostra as equações das retas dos agrotóxicos estudados bem como a razão entre os coeficientes angulares das curvas no solvente e no extrato da matriz.

Tabela 8: Intervalos de concentrações, equações da reta, coeficientes de correlação e razão dos coeficientes angulares dos agrotóxicos.

Agrotóxico	Intervalo de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Curva no solvente		Curva no extrato da matriz		RCA
		Equação da reta	r	Equação da reta	r	
Aldrin	0,0025 – 1	$y=146,5851+19423,3826x$	0,9993	$y=122,4761+18889,2522x$	0,9994	0,97
Ametrina	0,01 – 1	$y=-913,8308+50198,9205x$	0,9994	$y=544,9282+71548,1992x$	0,9999	1,43
Bromopropilato	0,0025 – 1	$y=480,7627+109346,6849x$	0,9999	$y=1382,5641+137186,907x$	0,9991	1,25
Bromuconazol	0,0025 – 1	$y=115,1972+84139,4413x$	0,9999	$y=599,8599+110950,1259x$	0,9996	1,32
Cipermetrina	0,005 – 1	$y=-38,0289+27353,2085x$	0,9999	$Y=377,9493+31384,8770x$	0,9992	1,15
Clorpirifós	0,005 – 1	$Y=-418,4325+61355,0995x$	0,9999	$y=788,3012+68573,1299x$	0,9996	1,12
Clorprofan	0,005 – 1	$y=-1166,1791+51499,5935x$	0,9989	$y=-377,8692+82011,5893x$	0,9998	1,6
Coumafós	0,005 – 1	$y=22,3880+46412,1316x$	0,9999	$y=411,4271+58795,9526x$	0,9995	1,27
Esfenvalerato	0,005 – 1	$y=-73,6385+39261,8978x$	0,9999	$Y=460,3489+44094,9015x$	0,9993	1,12
Etion	0,0025 – 1	$y=-909,8041+125662,4189x$	0,9996	$y=400,1772+172786,1613x$	0,9998	1,37

Tabela 8: continuação

Permetrina 1	0,0025 – 1	$y=43,5715+18400,3588x$	0,9998	$y=264,2941+23213,0554x$	0,9994	1,26
Permetrina 2	0,02 – 1	$y=-945,5531+21584,7334x$	0,9981	$Y=326,2975+44944,4321x$	0,9994	2,08
Pirimicarbe	0,0025 – 1	$y=-1209,5577+82723,6925x$	0,9988	$y=194,7592+100528,8722x$	0,9998	1,21
Pirimifós Metílico	0,0025 – 1	$y=-453,6162+50133,5598x$	0,9996	$y=171,8278+60906,6159x$	0,9997	1,21
Procimidone	0,02 – 1	$y=-70,6506+7683,4352x$	0,9996	$Y=69,8415+9476,5482x$	0,9997	1,23
Vinclozolin	0,005 – 1	$y=-216,3214+15866,7699x$	0,9996	$y=167,5733+17561,9406x$	0,9978	1,11

*RCA – razão entre os coeficientes angulares da curva no solvente e no extrato da matriz.

Os intervalos de concentração pré estabelecidos para este parâmetro foram escolhidos segundo a melhor faixa linear em comum para as duas curvas e contemplando uma faixa de trabalho esperada para limites máximos de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ver Tabela 1) [72].

Conforme observado na Tabela 8, todos os agrotóxicos apresentaram efeito matriz positivo com exceção do Aldrin. Esse comportamento é esperado uma vez que a matriz em estudo (tecido muscular de peixe) é considerada uma matriz complexa, e ainda levando em consideração as baixas concentrações em que as curvas foram construídas [49, 71].

Uma vez que de modo geral houve uma supressão/aumento da resposta cromatográfica do analitos em estudo, embora de maneira sutil, foram adotados como referência as quantificações dos agrotóxicos a partir da calibração no extrato da matriz.

4.3.3 *Exatidão e precisão*

Neste trabalho, a exatidão foi determinada pelos valores de recuperação obtidos através de ensaios de fortificação de amostras de tecido de tilápia isentas de contaminação em quatro níveis de concentração para cada pesticida em quintuplicata para cada nível.

Uma vez que para otimização do método de extração utilizando MSPD os testes foram desenvolvidos com nível de fortificação de $5,0 \mu\text{g g}^{-1}$; com a finalidade de assegurar a eficiência do método em concentrações baixas. Para os testes de exatidão, o método foi aplicado para as concentrações 0,02, 0,03, 0,05 e $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$. Esses valores encontram-se inseridos na faixa linear da curva.

Tabela 9: Resultados de recuperação média (%) e coeficientes de variação (CV) para os quatro níveis de fortificação testados.

Agrotóxicos	Fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação Média (%)	CV (%)
Aldrin	0,02	75	2,78
	0,03	106	7,04
	0,05	80	0
	0,1	74	6,14
Ametrina	0,02	70	6,45
	0,03	95	3,47
	0,05	71	2,64
	0,1	72	1,14
Bromopropilato	0,02	71	9,65
	0,03	91	1,26
	0,05	73	0,56
	0,1	70	1,55
Bromuconazol	0,02	93	11,30
	0,03	98	2,06
	0,05	82	5,63
	0,1	70	1,38
Cipermetrina	0,02	71	2,45
	0,03	101	10,92
	0,05	107	2,84
	0,1	75	3,63
Clorpirifós	0,02	104	4,59
	0,03	116	1,11
	0,05	92	0,46
	0,1	72	1,43

Tabela 9: continuação

Clorprofan	0,02	110	4,07
	0,03	113	1,18
	0,05	80	9,21
	0,1	71	4,35
Coumafós	0,02	82	0,39
	0,03	101	5,36
	0,05	85	6,37
	0,1	81	1,53
Esfenvalerato	0,02	80	7,71
	0,03	87	9,43
	0,05	83	10,03
	0,1	73	1,43
Etion	0,02	73	4,07
	0,03	97	3,13
	0,05	83	2,08
	0,1	79	3,10
Permetrina 1	0,02	79	9,62
	0,03	103	1,78
	0,05	74	2,79
	0,1	83	3,37
Permetrina 2	0,02	120	5,55
	0,03	76	3,27
	0,05	115	10,61
	0,1	71	1,76
Pirimicarbe	0,02	74	2,0
	0,03	93	1,90
	0,05	82	2,96
	0,1	76	0,65

Tabela 9: continuação

Pirimifós Metílico	0,02	83	3,21
	0,03	97	3,13
	0,05	77	3,28
	0,1	73	2,45
Procimidone	0,02	73	1,82
	0,03	104	5,29
	0,05	82	0,77
	0,1	73	1,63
Vinclozolin	0,02	79	9,22
	0,03	97	16,69
	0,05	73	1,40
	0,1	71	8,15

C.V.: coeficiente de variação.

A Tabela 9 atesta a exatidão do método, dado que a literatura estabelece um valor de recuperação entre 70 e 120%, e dependendo da complexidade do método aplicado e da matriz esse intervalo pode ser de 50 a 120%, com um coeficiente de variação (precisão) de até 20% [36, 68, 49].

A precisão de um método pode ser avaliada através de ensaios de repetibilidade ou em termos de reprodutibilidade [36, 68]. No presente estudo, a precisão foi avaliada de duas formas, a primeira pela repetibilidade, sendo usado o mesmo método, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, em uma mesma amostra, onde os ensaios foram realizados no mesmo dia. A precisão foi medida pelo coeficiente de variação (CV). A Tabela 9 mostra os coeficientes de variação obtidos.

A segunda avaliação da precisão foi feita analogamente à primeira, sendo testada a repetibilidade utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento, em uma mesma amostra, alterando apenas os dias de análise, onde nessa segunda avaliação foi testada a mesma amostra, com concentração $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$, em dias distintos.

A Tabela 10 mostra os coeficientes de variação obtidos para os testes de precisão interdia.

Tabela 10: Resultados de coeficientes de variação (CV) para teste de precisão interdia.

Agrotóxicos	CV (%)	Agrotóxicos	CV (%)
Aldrin	4,55%	Esfenvalerato	12,33%
Ametrina	6,68%	Etiona	11,64%
Bromopropilato	7,01%	Permetrina 1	14,46%
Bromuconazol	16,73%	Permetrina 2	17,47%
Cipermetrina	17,06%	Pirimicarbe	7,64%
Clorpirifós	6,94%	Pirimifós Metílico	6,98%
Clorprofame	1,71%	Procimidona	5,83%
Coumafós	11,07%	Vinclozolina	7,98%

Em todos os níveis de fortificação os agrotóxicos apresentaram valores de recuperação no intervalo entre 70 e 116% e com coeficientes de variação inferiores a 20%, atestando que o método apresenta exatidão e precisão dentro do aceitável. Para a Permetrina 2, na menor concentração estudada, o valor de recuperação foi de 125% com um coeficiente de variação de 5,55%, nesse caso, é preferível utilizar a Permetrina 1 para quantificação.

4.3.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Diversos métodos podem ser utilizados para determinar LD e LQ: método visual, sinal-ruído, através de parâmetros da curva analítica, dentre outros. A escolha do método para determinar LD e LQ deve considerar a técnica analítica utilizada e a confiabilidade estatística exigida. [49,71]

Para este trabalho, a avaliação do LQ e LD foram feitas utilizando parâmetros do *Manual of Pesticide Residues Analysis* [74], em que o LQ foi obtido observando os seguintes critérios: o LQ deve ser maior ou igual ao LD; a recuperação deve apresentar valores maiores que 70%; o coeficiente de variação deve ser menor ou igual a 20%. O menor valor da curva analítica (primeiro ponto da curva) obedeceu a todos esses critérios e, portanto é o LQ do método desenvolvido.

Para determinação do LD foi utilizada a relação da equação 2, onde o S é a média das recuperações, o σ representa o desvio das recuperações do nível de fortificação analisado, e o t é o coeficiente de correção, para 95% de confiança. O nível de fortificação analisado foi o menor nível, e portanto o LQ $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$.

$$\text{LDC} = \frac{2 \cdot t_{f,95} \cdot \hat{\sigma}_{\text{com}}}{S} \quad \text{Equação 2 [74]}$$

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos dos LD e LQ do método proposto para determinação de agrotóxicos em tecido muscular de Tilápia.

Tabela 11: Limite de detecção e quantificação dos agrotóxicos estudados.

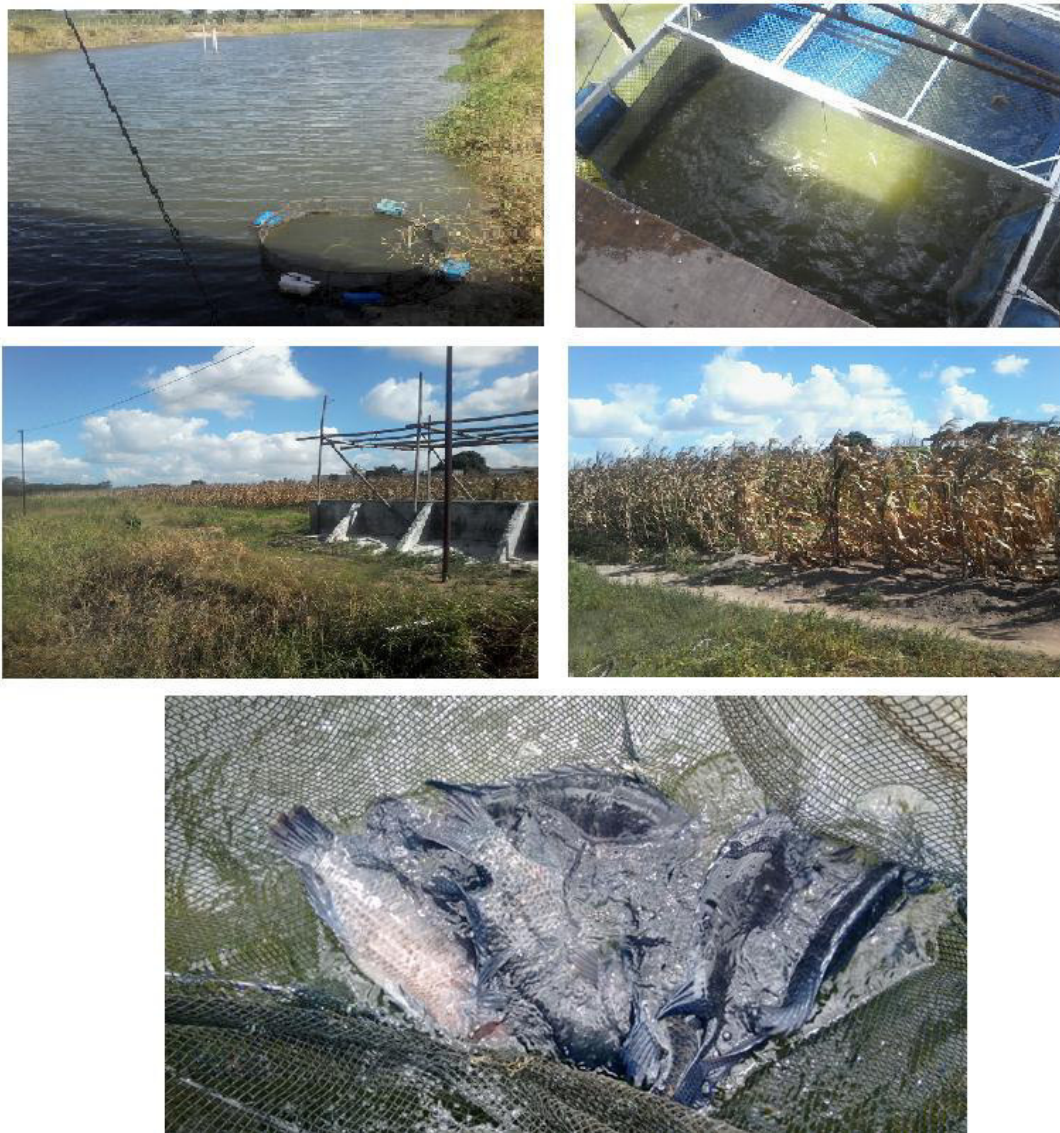
Agrotóxicos	Limite de detecção ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Aldrin	0,002	0,02
Ametrina	0,004	0,02
Bromopropilato	0,007	0,02
Bromuconazol	0,006	0,02
Cipermetrina	0,002	0,02
Clorpirifós	0,002	0,02
Clorprofam	0,002	0,02
Coumafós	0,0009	0,02
Esfenvalerato	0,004	0,02
Etiona	0,003	0,02
Permetrina 1	0,003	0,02
Permetrina 2	0,006	0,02
Pirimicarbe	0,006	0,02
Pirimifós Metílico	0,002	0,02
Procimidona	0,001	0,02
Vinclozolina	0,005	0,02

Pode-se observar que os limites de detecção e quantificação encontrados para os agrotóxicos variam entre 0,0009 – 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, os quais podem ser considerados satisfatórios uma vez que apesar de não existir legislação vigente para limite máximo de resíduo de agrotóxicos em Tilápia, os valores para esses limites são baixos o suficiente para o que é esperado como LMR em diversas matrizes alimentares.

5. Aplicação em amostras reais

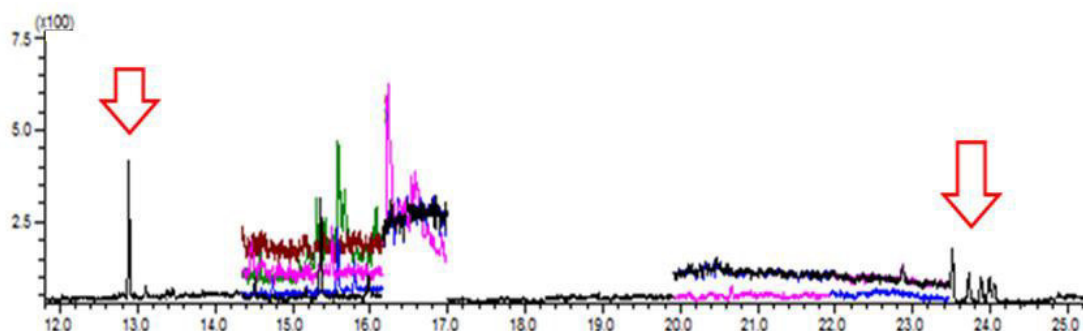
Uma Tilápia de 950 g foi adquirida em um centro de distribuição na cidade de Itabaiana, Sergipe. Conforme mostrado na Figura 22, nota-se a presença de plantações ao redor dos tanques de armazenamento de peixe, o que justifica a escolha das amostras do local para aplicação do método desenvolvido.

Figura 22: Imagens do local de coleta, em Itabaiana, Sergipe.



Ao analisar a amostra coletada, nas condições estabelecidas pelo método, foi verificado a presença de 2 dos agrotóxicos em estudo: Clorprofan e Cipermetrina com concentrações de 0,04 e 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A Figura 23 mostra o cromatograma do extrato no modo *MRM*, onde é possível observar a presença dos agrotóxicos identificados.

Figura 23: Cromatograma por monitoramento de reações múltiplas da análise de tecido muscular de Tilápia coletada no centro de distribuição do município de Itabaiana-SE.



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de cromatografia gasosa/espectrometria de massas sequencial mostrou-se adequada para a identificação dos agrotóxicos aldrin, ametrina, bromopropilato, bromuconazol, cipermetrina, clorpirifós, clorprofam, coumafós, esfenvalerato, etiona, permetrina, pirimicarbe, pirimifós metílico, procimidona, vinclozolina, uma vez que possibilitou a análise simultânea com efetiva separação dos analitos.

O método de extração proposto por dispersão da matriz em fase sólida (DMFS), empregando 0,5 g de alumina neutra como adsorvente auxiliar, 0,75 g de C₁₈ como adsorvente dispersante, 0,25 g de músculo de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) e 5 mL de acetonitrila como solvente de eluição apresentou valores de recuperação satisfatórias dos analitos atingindo a faixa de 78 a 88% para a concentração 0,05 µg g⁻¹.

O biocarvão produzido a partir de rejeitos de coco se mostrou eficiente como adsorvente dispersante alternativo na DMFS, quando utilizado em conjunto com a alumina neutra como adsorvente auxiliar, uma vez que as recuperações obtidas foram de 70 a 120% para a concentração 0,02 µg g⁻¹; 76 a 116% para a concentração 0,03 µg g⁻¹; 88 a 155% para a concentração de 0,05 µg g⁻¹, e 70 a 83% para a concentração 0,1 µg g⁻¹, contribuindo para um uso alternativo de um rejeito da indústria alimentícia, a fim de substituir adsorventes de alto custo.

Os parâmetros de validação avaliados apresentaram valores satisfatórios assegurando a determinação de resíduos dos agrotóxicos aldrin, ametrina, bromopropilato, bromuconazol, cipermetrina, clorpirifós, clorprofam, coumafós, esfenvalerato, etiona, permetrina, pirimicarbe, pirimifós metílico, procimidona, vinclozolina em tecido muscular de tilápia (*Oreochromis niloticus*) aplicando o método de extração de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e análise por cromatografia gasosa com espectrometria de massas sequencial (GC-MS/MS) com garantia de eficiência e boa sensibilidade.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Santos, R.L.; Eler, M.N.; Espíndola, E.L.G.; Vieira, E.M. O Uso de Praguicidas nas Pisciculturas e Pesqueiros Situados na Bacia do Rio Mogi-guaçu. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, 2009, 35(3): 343-358.
- [2] Botelho, R.G.; Alves, P.A.T.; Maranhão, L.A.; Monteiro, S.H.; Sousa, B.I.A.; Avelar, D.S. e Tornisiello, V.L. Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura. Revista Visão Agrícola. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, USP, SP, 2012, 11, 45-48.
- [3] EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Criação Sustentável de Peixes no Brasil. <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/848/criacao-sustentavel-de-peixes-no-brasil> (acessado em março 2016).
- [4] Ministério da Pesca e Aquicultura, Cartilha Balanço 2013. <http://www.mpa.gov.br/biografia/58-assuntos/monitoramento-e-controle> (acessado em abril 2016).
- [5] Ministério da Pesca e Aquicultura, Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira - 2015/2020. 2015. <http://www.mpa.gov.br/ultimas-noticias/2804-helder-barbalho-lanca-o-plano-de-desenvolvimento-da-aquicultura-brasileira> (acessado em abril 2016).
- [6] Teixeira, H.M.; Ferreira, J.M.L.; Lobo, L.M.; Nogueira, R.S. Avaliação do potencial de contaminação por agrotóxicos em corpos d'água. 8º Seminário de Iniciação Científica Tecnológica, Belo Horizonte, MG, 2011.
- [7] Arias, A.R.L.; Buss, D.F.; Albuquerque, C.; Inácio, A.F.; Freire, M.M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Revista Ciência Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, 2007, 12, no.01.

[8] Baird, C.; Cann, M.; *Química Ambiental*, 4ª ed.; Bookman: Porto Alegre, 2011, pp 437-486.

[9] Maximiano, A.A.; Fernandes, R.O.; Nunes, F.P.; Assis, M.P.; Matos, R.V.; Barbosa, C.G.S.; Oliveira-Filho, E.C. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. *Revista Ciência Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro 2005, 10, pp 483 - 491.

[10] Borges, K.B.; Figueiredo, E.C.; Queiroz, M.E.C. *Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos*, 1ª ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2015, pp 2-8; 80-87.

[11] Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: São Paulo, 2006, pp 17-29; 203-272.

[12] Ferracini, V.L.; Queiroz, S.C.N.; Rosa M.A.; Souza, D.R.C.; Queiroz, J.F.; Paraiba, L.C. Análise de Agrotóxicos Organoclorados em Camarão e Pescado por Cromatografia a Gás com Detector de Micro Captura de Elétrons (GC-mECD). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014, 24, 13-20.

[13] Simões, M.R.; Ribeiro, C.F.A., Ribeiro, S.C.A.; Park, K.J.; Murr, F.E.X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 2007, 27 no.3, 08-613.

[14] Empresa Estância Alvorada.
<http://www.estanciaalvorada.com.br/valoresNutricionais.pdf>. (acessado em junho, 2016).

[15] MMA – Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos.
<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos> (acessado em abril 2016).

- [16] Spiro, T.G.; Stigliani, W.M. *Química Ambiental*. 2ª ed.; Pearson, Prentice Hall: São Paulo, 2009, pp 267-276.
- [17] Fenik, J.; Tankiewicz, M.; Biziuk, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, **2011**, *30*, 814-826.
- [18] Ministério da Saúde. Governo Federal. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Departamento Técnico Normativo. Portaria no. 3 de 16 de janeiro de 1992. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Legislacao+de+Agrotoxicos+Componentes+e+Afins/Portarias> (acessado em abril, 2016).
- [19] Omoto, C. Avanços na Implementação de Programas de Manejo da Resistência de Pragas a Pesticidas no Brasil. Piracicaba, SP. http://www.den.ufla.br/siteantigo/Professores/Jair/Resist%EAncia_modoa%E7%E3o%20acaricidas.doc. (acessado em junho, 2016).
- [20] *Faculdade de Agronomia* da Universidade da República do Uruguai. Dicarboximidas. <http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pfvid/SemDicarboximidas.pdf> (acessado em junho, 2016).
- [21] Winkaler, E.U.; Aspectos Ecotóxicológicos dos Inseticidas Diflubenzuron e Teflubenzuron para o Pacu (*piaractus mesopotamicus*). Tese de doutorado. UNESP, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, 2008.
- [22] Empresa Osato. <http://www.pesqueiroosato.com/tilapia/>. (acessado em junho, 2016).
- [23] Capriotti, A.L.; Cavaliere C.; Foglia, P.; Samperi, R.; Stampachiacchiere, S.; Ventura, S.; Laganà, A. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 186–193.

- [24] Barker, S.A.; Long, A.R.; Short, C.R. Isolation of Drug Residues from Tissues by Solid Phase Dispersion. *Journal of Chromatography* **1989**, *475*, 353-361.
- [25] Barker, S.A. Matrix solid phase dispersion (MSPD) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2007**, *70*, 151–162.
- [26] Kristenson, E.M.; Ramos, L.; Brinkman, U.A.Th. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 2.
- [27] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, 8^a ed, Thomson, 2006, pp. 870-874.
- [28] Aquino, A.; Desenvolvimento e Validação de Método para Determinação de Resíduos de Pesticidas na Planta Medicinal desidratada *Hyptis pectinata* utilizando DMFS e CG/EM. Dissertação de mestrado. UFS, Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE, 2011.
- [29] Gross, J.H.; *Mass Spectrometry A Textbook*, 1st ed., Springer:Germany, 2004, pp. 1-5.
- [30] Vekey, K.; Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A* **2001**, *921*, 227-236.
- [31] Lehotay, S.J.; Mastovska, K. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1040*, 259-272.
- [32] Rezaei, F.; Hosseini, M.-R.M. New method based on combining ultrasonic assisted miniaturized matrix solid-phase dispersion and homogeneous liquid–liquid extraction for the determination of some organochlorinated pesticides in fish. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *702*, 274– 279.

- [33] Caldas, S.S.; Bolzan, C.M.; Menezes, E.J.; Escarrone, L.V.; Martins, C.M.G.; Bianchini, A.; Primel, E.G. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. *Talanta* **2013**, *112*, 63–68.
- [34] *Empresa Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science* <https://www.sigmaaldrich.com/>. (acessado em junho 2016).
- [35] *The PubChem Project*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. (acessado em junho 2016).
- [36] *Anvisa*. <https://novoportal.anvisa.gov.br/>. (acessado em junho 2016).
- [37] *LookChem, look for chemicals all over the world*. <https://www.lookchem.com/>. (acessado em junho 2016).
- [38] *ChemSpider | Search and share chemistry*. <https://www.chemspider.com/>. (acessado em junho 2016).
- [39] Rodrigues, S.A.; Caldas, S.S.; Primel, E.G. A simple, efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *678*, 82–89.
- [40] Shen, Q.; Jin, R.; Xue, J.; Lu, Y.; Dai, Z. Analysis of trace levels of sulfonamides in fish tissue using micro-scale pipette tip-matrix solid-phase dispersion and fast liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **2016**, *194*, 508–515.
- [41] Pan, X-D.; Wu, P-G.; Jiang, W.; Ma, B-J. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in fish muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control* **2015**, *52*, 34–38.

[42] Cela-Pérez, M.C.; Barbosa-Pereira, L.; Vecino, X.; Pérez-Ameneiro, M.; Latorre, A.L.; López-Vilariño, J.M.; Rodríguez, M.V.G.; Moldes, A.B.; Cruz, J.M. Selective removal of ATP degradation products from food matrices II: Rapid screening of hypoxanthine and inosine by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion for evaluation of fish freshness. *Talanta* **2015**, *135*, 58–66.

[43] Chen, C-L.; Tsai, D-Y.; Ding, W-H. Optimisation of matrix solid-phase dispersion for the determination of dechlorane compounds in marketed fish. *Food Chemistry* **2014**, *164*, 286-292.

[44] Tao, Y.; Zhu, F.; Chen, D.; Wei, H.; Pan, Y.; Wang, X.; Liu, Z.; Huang, L.; Wang, Y.; Yuan, Z. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-phenols determination in shrimp and fish by liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* **2014**, *150*, 500–506.

[45] Moliner-Martínez, Y.; Campíns-Falcó, P.; Molins-Lagua, C.; Segovia-Martínez, L.; Seco-Torrecillas, A. Miniaturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 6741-6745.

[46] Caldas, S. S.; Rombaldi, C.; Cerqueira, M.B.R.; Soares, B.M.; Primel, E.G. Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. *Scientia Chromatographica* **2013**, *5*(3), 190-213.

[47] Extração em fase sólida.
http://www.unifal_mg.edu.br/latf/files/Extra%C3%A7%C3%A3o%20em%20fase%20s%C3%B3lida.pdf. (acessado em junho, 2016).

[48] Lanças, F.M. *Extração em fase sólida – SPE*. São Carlos, SP: RIMA, 2004, pp 10,11, 54-56.

- [49] Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, 27 (5), 771-780.
- [50] Laird, D.A. The charcoal vision: a win-win-win scenario for simultaneously producing bioenergy, permanently sequestering carbon, while improving soil and water quality. *Agronomy Journal* **2008**, 100, 178-181.
- [51] Luo, L.; Lou, L.P.; Cui, X.Y.; Wu, B.B.; Hou, J.; Xun, B.; Xu, X.H.; Chen, Y.X. Sorption and desorption of pentachlorophenol to black carbon of three different origins, *Journal of Hazardous Materials* **2009**, 185, 639-646.
- [52] Cha, J.S.; Park, S.H.; Jung, S-C.; Ryu, C.; Jeon, J-K.; Shin, M-C.; Park, Y-K. Production and utilization of biochar: A review, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2016**, article in press.
- [53] Santos, R.A.C.; Desenvolvimento de Método para Determinação de Agrotóxicos (Pertubadores Encócrinos) em Água. Dissertação de mestrado. UFS, Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE, 2016.
- [54] Kubitza, F. Aquicultura no Brasil, Conquistas e Desafios. *Revista Panorama da Aquicultura*, 2015 julho/agosto, 25 no150, 10-13.
- [55] EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_42.pdf (acessado em junho 2016).
- [56] Lanças, F.M.; Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação: uma visão pessoal. *Scientia Chromatographica* **2008**, 0, 17-44.
- [57] Lanças, Fernando M. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009, pp. 342-346.

- [58] Barceló, D.; Hennion, M.C. Trace determination of pesticides and their degradation products in water. *The Netherlands: Elsevier* **1997**, 3, 542.
- [59] Chiaradia, M.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. O Estado da Arte da Cromatografia Associada à Espectrometria de Massas Acoplada à Espectrometria de Massas na Análise de Compostos Tóxicos em Alimentos *Química Nova* **2008**, 31, 3, pp. 623-636.
- [60] Augusto, F.; Hantao, L. W.; Mogollón, N. G. S.; Braga, S.C.G.N. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* **2013**, 43, pp. 14-23.
- [61] Namasivayam, C.; Kumar, M. D; Selvi, K.; Begum, R. A; Vanathi, T.; Yamuna, R. T. 'Waste' cair Pith – a Potencial Biomass for the Treatment of Dyeing Wastewaters. *Biomass & Energy* **2001**, 21, pp. 477-483.
- [62] Tang, J.; ZHU, W.; Kookana, R.; Katayama, A. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2013**, 116, 6, pp. 653-659.
- [63] Lehmann, J.; Joseph, S. Biochar for environmental management science and technology. **2009**, Earthscan Publisher, Londres, Reino Unido.
- [64] Mandal, A.; Singh, N.; Purakayastha, T. J., Characterization of pesticide sorption behaviour of slow pyrolysis biochars as low cost adsorbent for atrazine and imidacloprid removal. *Science of the Total Environment* **2017**, 577, 376–385.
- [65] Beesley, L.; Moreno-Jiménez, E.; Gomez-Eyles, J. L.; Harris, E.; Robinson, B.; Sizmur, T. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environmental Pollution* **2011**, 159, 3269-3282.

- [66] Ali, I.; Asim, M.; Khan, T. A. Low cost adsorbents for the removal of organic pollutants from wastewater. *Journal of Environmental Management* **2012**, 113, 170-183.
- [67] Leite, F. *Validação em análise química*, 5ª ed. Átomo, 2008.
- [68] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- [69] Araújo, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* **2009**, 877, 2224-2234.
- [70] EURACHEM. <https://www.eurachem.org/> (acessado em novembro 2016).
- [71] Lanças, F. M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*, RiMA, São Carlos, 2004, pp. 9-28.
- [72] Krueve, A.; Kunnappas, A.; Herodes, K.; Leito, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1187, 58–66.
- [73] Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova* **2009**, v32, pp. 987-995.
- [74] Thier, H. P.; Zeumer, H. *Manual of Pesticide Residue Analysis*, VHC, Weinheim, 1a. ed, 1987, volume 1, pp 37-44.

ANEXO

Tabela A: Informações nutricionais para uma porção de 100 g. **Fonte:** [14]

Nutriente	Unidade	Valores por 100 gramas
Elemento		
Água	g	78,08
Energia	Kcal	96
Energia	Kj	400
Proteína	g	20,08
Lipídios totais (gorduras)	g	1,70
Cinzas	g	0,93
Carboidratos	g	0,00
Fibras	g	0,00
Açúcares totais	g	0,00
Minerais		
Cálcio, Ca	mg	10
Ferro, Fe	mg	0,56
Magnésio, Mg	mg	27
Fósforo, P	mg	170
Potássio, K	mg	302
Sódio, Na	mg	52
Zinco, Zn	mg	0,33
Cobre, Cu	mg	0,075
Manganês, Mn	mg	0,037
Selênio, Se	µg	41,8
Vitaminas		
Vitamina C	mg	0,0
Tiamina	mg	0,041
Riboflavina	mg	0,063
Niacina	mg	3,903
Ácido pantotênico	mg	0,487

Vitamina B-6	mg	0,162
Folato total	µg	24
Folato, alimento	µg	24
Folato, DFE (folato dietético)	µg	24
Colina, total	mg	42,5
Betaina	mg	21,7
Vitamina B-12	µg	1,58
Vitamina E	mg	0,40
Vitamina K	µg	1,4

APÊNDICE

